

**Novel polymerized, cross-linked, stromal-free hemoglobin**

**Publication number:** US4001200 (A)  
**Publication date:** 1977-01-04  
**Inventor(s):** BONSEN PIETER; LAVER MYRON B; MORRIS KENT C  
**Applicant(s):** ALZA CORP  
**Classification:**  
 - **international:** *A61K35/18; A61K38/16; C07K14/805; C08H1/00; A61K38/00; A61M1/36; A61K35/18; A61K38/16; C07K14/795; C08H1/00; A61K38/00; A61M1/36; (IPC1-7): C07C103/52; A61K37/00*  
 - **European:** C07K14/805; C08H1/00  
**Application number:** US19750554051 19750227  
**Priority number(s):** US19750554051 19750227

**Also published as:**

-  NL7601883 (A)
-  SE7601567 (A)
-  MX3347 (E)
-  JP51109983 (A)
-  IT1057607 (B)
-  IL49028 (A)
-  GB1503072 (A)
-  FR2302104 (A1)
-  ES445258 (A1)
-  DK64176 (A)
-  DE2607706 (A1)
-  CH629961 (A5)
-  CA1056728 (A1)
-  BE638933 (A1)
-  AU1108376 (A)
-  AU498281 (B2)
-  AT356275 (B)

<< less

**Cited documents:**

-  US3057782 (A)

**Abstract of US 4001200 (A)**

This invention concerns polymerized, cross-linked, stromal-free hemoglobin useful as a blood substitute for carrying oxygen to tissues and organs, as a blood plasma expander and for supplying oxygen to oxygen-requiring environments.

.....  
 Data supplied from the *esp@cenet* database --- Worldwide

⑤

Int. Cl. 2:

**C 07 G 7/00**

⑯ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

A 61 K 37/14



**DT 26 07 706 A 1**

⑪

# Offenlegungsschrift **26 07 706**

⑫

Aktenzeichen: P 26 07 706.5

⑬

Anmeldetag: 25. 2. 76

⑭

Offenlegungstag: 9. 9. 76

⑳

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

27. 2. 75 USA 554051

㉔

Bezeichnung: Wasserlösliches, polymerisiertes Hämoglobin

㉕

Anmelder: Alza Corp., Palo Alto, Calif. (V.St.A.)

㉖

Vertreter: Wuesthoff, F., Dr.-Ing.;  
Pechmann, E. Frhr. von, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Behrens, D., Dr.-Ing.;  
Goetz, R., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München

㉗

Erfinder: Bosen, Pieter, Los Altos, Calif.; Laver, Myron B., Weston, Mass.;  
Morris, Kent C., Mountain View, Calif. (V.St.A.)

**DT 26 07 706 A 1**

DR. ING. F. WUESTHOFF  
DR. E. v. PECHMANN  
DR. ING. D. BEHRENS  
DIPL. ING. R. GOETZ  
PATENTANWÄLTE

6 MÜNCHEN 80  
SCHWINGSTRASSE 2  
TELEFON (059) 88 20 51  
TELEX 5 24 070  
TELEGRAMME:  
PROTECPATENT MÜNCHEN

1A-47 610

2607706

B e s c h r e i b u n g  
zur Patentanmeldung der

ALZA CORPORATION  
950 Page Mill Road, Palo Alto, Californien 94304, USA

betreffend  
Wasserlösliches, polymerisiertes  
Hämoglobin

Die Erfindung betrifft ein wasserlösliches, polymerisiertes, vernetztes Hämoglobin, das frei ist von Stroma und geeignet für Blutersatzstoffe, um Sauerstoff zu dem Gewebe und Organen zu transportieren und in Blutplasma-Streckmitteln. Das Polyhämoglobin wird hergestellt durch Umsetzung von stromafreiem Hämoglobin mit einem geeigneten Vernetzungsmittel.

Hämoglobin ist im Blut von Säugetieren vorhanden und es besitzt die grundlegende Eigenschaft, daß es in Lösung reversibel oxidiert werden kann. In der natürlichen Form ist Hämoglobin von Säugetieren ein konjugiertes nicht vernetztes Protein, das ein Molekulargewicht von 64 500 hat und strukturell aus zwei Untereinheiten besteht. Jede Untereinheit enthält eine Hämgruppe und eine Polypeptidkette, genannt Globin. Bei Säugetieren ist Hämoglobin in Erythrocyten zusammen mit Stroma vorhanden, das aus Proteinen, Phospholipiden und Cholesterin besteht. Die Umsetzung von isoliertem Rinder-Hämoglobin, enthaltend Stroma mit überschüssigem Glutaraldehyd unter Bildung eines unlöslichen Niederschlages, ist in Histochemical J., Band 2, Seiten 137 bis 150, 1970, beschrieben. Ähnlich ist die Umsetzung von Proteinen aus ganzem Blut

2607706

mit Glutaraldehyd unter Bildung eines wasserunlöslichen Leims in der US-PS 3 294 564 angegeben. Die Wechselwirkung von dem Kollagen und Gelatine mit Diisocyanaten und anderen mehrfach kuppelnden Mitteln, einschließlich Aldehyden ist in den US-PS 2 591 133 und 3 057 782 sowie in Biochemica et Biophysica Acta, Band 168, Seiten 341 bis 352, 1968, angegeben. Die Carboxyalkylierung von Globin zur Verwendung als Plasma-Streckmittel ist in der US-PS 2 719 837 beschrieben. Die dort beschriebenen Produkte besitzen jedoch nicht die Fähigkeit, Sauerstoff zu transportieren und infolgedessen gelangten sie nicht zur allgemeinen Anwendung. Die US-PS 2 527 210 beschreibt die Verwendung von Hämoglobin zur Behandlung von Wunden. Die US-PS 3 000 836 und 3 519 572 beschreiben Blutzubereitungen, die als Standard zur Messung von Hämoglobin geeignet sind. In der NL-PS 7 404 140 ist ein wasserlösliches, vernetztes Hämoglobin beschrieben, das Stroma enthält und als Plasmaersatz angewandt werden soll.

Die vorliegende Erfindung betrifft wasserlösliches, polymerisiertes, vernetztes Hämoglobin, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es stromafrei ist und imstande, reversibel einen Liganden zu binden.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung des oben angegebenen wasserlöslichen, polymerisierten, vernetzten Hämoglobins, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Stroma und Zelltrümmer von dem Hämoglobin entfernt, das entstehende stromafreie Hämoglobin, das entweder einen Liganden enthält oder nicht, mit einem polyfunktionellen Vernetzungsmittel umsetzt, das mit den reaktionsfähigen Gruppen des Hämoglobins reagiert, unter einer Atmosphäre aus einem Schutzgas und unter Bedingungen, bei denen ein wasserlösliches, polymerisiertes, vernetztes Hämoglobin entsteht, und die Reaktion durch Zugabe eines Deaktivators für das Vernetzungsmittel zu dem Reaktionsgemisch abbricht.

.. /3

609837/0973

2607706

Außerdem betrifft die Erfindung pharmazeutische Mittel, enthaltend einen Blutersatzstoff oder ein Blutplasma-Streckmittel im Gemisch mit einem physiologisch geeigneten Träger, die dadurch gekennzeichnet sind, daß der Blutersatzstoff oder das Plasma-Streckmittel das oben beschriebene wasserlösliche, polymerisierte, vernetzte Hämoglobin ist.

Die Ausdrücke "polymerisiertes Hämoglobin", "vernetztes Hämoglobin" und "makromolekulares Hämoglobin" werden im folgenden ersetzt durch den Ausdruck "Polyhämoglobin" und die Ausdrücke "polymerisiertes Hämoglobin", "vernetztes Hämoglobin", "makromolekulares Hämoglobin" und "Polyhämoglobin" werden im Rahmen dieser Beschreibung als äquivalent angesehen. Unter Polyhämoglobin ist zumindest ein Hämoglobin-Tetramer,  $Hb_4$ , zu verstehen, vernetzt in dem Tetramer oder mit mindestens einem <sup>anderen</sup> hämhaltigen Hämoglobin-Monomer, Hb, unter Bildung der makromolekularen Verbindung der allgemeinen Formel  $Poly(Hb)_n$ , wobei Hb das Hämoglobin-Monomer und n 4 bis 60, üblicherweise 8 bis 30 bedeutet.

Das erfindungsgemäße Polyhämoglobin ist löslich in wäßrigen Flüssigkeiten mit einem pH-Wert von 6 bis 9 und in physiologischen Flüssigkeiten. Das Polyhämoglobin besitzt ein Molekulargewicht von 64 000 bis 1 000 000 und die Eigenschaft, in Lösung reversibel gasförmige Liganden in einer Menge bis zu 60  $\mu$ Mol Ligand/<sup>Poly</sup>g Hämoglobin zu binden, d.h. die Fähigkeit, Liganden zu binden, liegt nahe bei 100 %. Das Polyhämoglobin zeigt, je nach seiner Herstellung, einen Liganden-Teildruck bei halber Sättigung von 2,5 bis 120 mm Hg bei 37°C, gemessen bei neutralem pH und Atmosphärendruck. Die Polyhämoglobinlösungen besitzen eine Intrinsic-Viskosität von 0,04 bis 0,16 dl/g und zeigen Spektren im ultra-violetten und sichtbaren Licht, ähnlich wie nicht vernetztes Hämoglobin. Das Polyhämoglobin im oxidierten Zustand, wenn das Eisen des Häms dreiwertig ist und das Polyhämoglobin vernetztes stromafreies Polymethämoglobin ist, besitzt einen molekularen Extinktionskoeffizienten,  $\epsilon$ , bei 630 nm =  $3,5 \pm 0,4 \times 10^3$  in Abwesenheit eines Häm-

409837/0973

ORIGINAL INSPECTED . ./4

liganden und  $\xi$  bei 540 =  $9,5 \pm 0,5 \times 10^3$  für vernetztes stromafreies Polycyanomethämoglobin (Polymethämoglobin mit Cyanid als Hämliganden).

Das Polyhämoglobin wird hergestellt, indem man von Erythrocyten ausgeht, die von frisch entnommenem menschlichen Blut, überaltertem (outdated) ganzen Blut oder Placentas gewonnen worden sind, gepackten Erythrocyten, die von Blutspendezentren erhalten worden sind, oder Erythrocyten von tierischem Blut. Das Blut wird in Flaschen gezogen, die ein Antikoagulans enthalten, zentrifugiert und das überstehende Plasma abgezogen. Das Zentrifugieren wird bei  $-5$  bis  $40^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise  $4$  bis  $6^{\circ}\text{C}$  ungefähr  $5$  bis  $60$  Minuten bei  $650$  bis  $6500\text{g}$  durchgeführt, wobei das Plasma und der Leukocytenfilm im zentrifugierten Blut (buffy coat) abgetrennt und verworfen werden. Anschließend werden die roten Zellen in ungefähr  $1$  bis  $4$  Volumina kalter isotonischer oder hypertotonischer Salzlösung gewaschen, die Suspension zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit erneut entfernt und verworfen. Die roten Zellen werden weitere  $2$ - bis  $3$ mal gewaschen, wobei die Waschflüssigkeiten nach jedem Zentrifugieren verworfen werden.

Das Verfahren zur Herstellung des Ausgangsmaterials für die Polymerisation umfaßt ein Isolieren des Hämoglobins aus den Zellen, das im wesentlichen frei ist von Zelltrümmern und Stroma. Die Entfernung von Stromaproteinen und Lipiden ist erfindungsgemäß kritisch und ihre Entfernung schließt im wesentlichen eine Nierenschädigung aus. Das Verfahren zur Herstellung von stromafreiem Hämoglobin umfaßt zunächst ein Lysieren (Lösen) der Zellen in ungefähr  $1$  bis  $4$  Volumina kaltem Wasser oder anderen lysierenden Lösungen, wie hypotonischen Phosphatpufferlösungen und hypotonischer Salzlösung. Nach der Lyse wird die Suspension von roten Zellen geschüttelt und kaltes Toluol in einer Menge von ungefähr  $10$  bis  $200\%$  des Zellvolumens, üblicherweise etwa  $10$  bis  $30$  Volumen-% zugegeben. Das Gemisch wird dann  $4$  bis  $10$  Minuten geschüttelt und  $24$  bis  $72$  Stunden bei  $4$  bis  $6^{\circ}\text{C}$  stehengelassen, wobei ein dreiphasiges Gemisch entsteht. Die

ORIGINAL INSPECTED

609837/0973

..15

2607706

untere klare rote Schicht wird isoliert und mit 40 000 bis 50 000g mindestens 60 Minuten bei ungefähr 4 bis 6°C zentrifugiert, dann wird die obere klare Flüssigkeit abgetrennt und durch ein Diatomeenerdefilter filtriert. Bei dieser Filtration werden Spuren von Stroma entfernt und verschiedene bekannte Präzipitationstests können angewandt werden, um festzustellen, ob das Hämoglobin stromafrei ist.

Restliche niedermolekulare Salze und Metaboliten werden von dem stromafreien Hämoglobin durch Dialyse gegen Standard- oder medizinisch geeignete Puffer entfernt. Puffer, die für diesen Zweck geeignet sind, umfassen 0,05 m Phosphatlösung und physiologische Salzlösung, gepuffert mit Alkalibicarbonaten. Das stromafreie Hämoglobin kann dialysiert werden unter Verwendung von handelsüblichen Vorrichtungen wie einem Dow-miniplant unter Verwendung von Biofiber<sup>®</sup> - 50, Dialysefasern, dem Kolffsystem unter Verwendung einer semipermeablen Membran oder einer Crom-A-Coil<sup>®</sup> -Einheit oder semipermeablen Dialysemembranen wie Zellulose, Zelluloseacetat und modifizierten Zelluloseacetatmembranen wie N,N-Diäthylamino-äthylzellulose-acetat und Zellulose-propionat.

Die Dialyse wird bei 4 bis 6°C durchgeführt, indem man die stromafreie Hämoglobinlösung durch Zellulose-Hohlfasern leitet, wobei das Hämoglobin gegen einen Puffer dialysiert wird, der außen an den Fasern entlangeleitet wird. Im allgemeinen besitzen die Fasern eine Trenngrenze (exclusion limit), die den Durchgang von niedermolekularen gelösten Stoffen erlaubt, ohne daß Hämoglobin mitaustritt. Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit ist größer als 1 ml/min, vorzugsweise 3 bis 25 ml/min. Das stromafreie Hämoglobin wird dreimal durch die Fasern geleitet, um Gleichgewicht einzustellen.

Anschließend wird das dialysierte Hämoglobin polymerisiert unter Bildung von wasserlöslichem makromolekularem vernetztem stromafreiem Polyhämoglobin. Das stromafreie Hämoglobin

2607706

zur Vernetzung kann entweder einen Liganden enthalten oder nicht, je nachdem, ob Hämliganden vorhanden sind oder nicht. Wenn Sauerstoff oder Kohlenmonoxid als Hämliganden vorhanden sind, ist das Hämoglobin bekannt als Oxyhämoglobin bzw. Carbomonoxyhämoglobin. Wenn kein Hämligand vorhanden ist, nennt man das Hämoglobin Deoxyhämoglobin. Das Oxyhämoglobin und Carbomonoxyhämoglobin werden hergestellt durch Äquilibriumierung mit den entsprechenden Gasen, Sauerstoff und Kohlenmonoxid, bei einer Temperatur von 4 bis 6°C ungefähr 30 bis 60 Minuten lang. Deoxyhämoglobin wird hergestellt durch wiederholte Behandlung der Lösung unter verringertem Druck, üblicherweise ungefähr 250 mm Hg und anschließendes Spülen mit Stickstoff oder einem inerten Gas wie Argon oder Neon. Deoxyhämoglobin kann auch hergestellt werden durch chemische Deoxygenierung unter Zugabe von Reduktionsmitteln wie Natriumdithionit oder Natriumsulfit. Die bevorzugten Formen von Hämoglobin zur Herstellung des erfindungsgemäßen Polyhämoglobins sind Oxyhämoglobin und Deoxyhämoglobin. Das Vernetzen dieser Hämoglobine ergibt Polyhämoglobine mit einem  $P_{50}$ -Wert von ungefähr 4 bis 120 mm Hg bei ungefähr physiologischen Bedingungen (37°C, pH 7,1) je nach der Art der Herstellung des Polyhämoglobins. Dieser Bereich von  $P_{50}$ -Werten von 4 bis 120 mm Hg umfaßt die Hämoglobin-Sauerstoff-Affinitäten wie sie sich in Blut und freiem natürlich vorkommendem Hämoglobin finden.

Die Polymerisation von dialysiertem stromafreiem Hämoglobin wird durchgeführt durch intermolekulare Vernetzung, üblicherweise der primären Aminogruppe des Lysinrestes unter Bildung von wasserlöslichem Polyhämoglobin. Die Vernetzung wird durchgeführt in Gegenwart mindestens eines polyfunktionellen Vernetzungsmittels unter Bildung von mehr als 90 % makromolekularem Hämoglobin. Die Polymerisation wird durchgeführt, indem man zunächst das Reaktionsgefäß mit dem entsprechenden Gas spült. Dann wird das Hämoglobin unter einer Schutzatmosphäre des entsprechenden Gases vernetzt. Die Reaktion wird 0,25 bis 300 Stunden bei 0 bis 25°C unter Atmosphärendruck

.. / 7

609837/0973

2607706

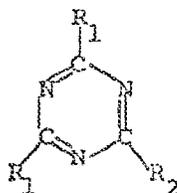
durchgeführt. Höhere Drücke bis zu 500 kPa können ebenfalls angewandt werden. Vorzugsweise wird die Temperatur zwischen 0 und 10°C gehalten, um eine thermische Oxidation von Hämoglobin zu vermeiden. Temperaturen im Bereich von 4 bis 6°C sind besonders bevorzugt. Im allgemeinen wird ungefähr ein Äquivalent Hämoglobin mit einem Molekulargewicht von 64 000 mit 2,5 bis 300 Äquivalent des polyfunktionellen Vernetzungsmittels umgesetzt.

Die Reaktion wird abgebrochen durch Zugabe eines Vernetzungsmittel-Desaktivators wie eines niedermolekularen Amins (wie die Konzentration an Vernetzungsmittel zunimmt, kann die Neigung zur Bildung unlöslicher Polymerisationsprodukte zunehmen und das kann verhindert werden durch Zugabe eines Teils des Desaktivators vor der Zugabe des Vernetzungsmittels). Die zugesetzte Menge an Desaktivator wird so gewählt, daß sie ausreicht, um mit den nicht umgesetzten funktionellen Gruppen eines Vernetzungsmittels, das an eine Hämoglobingruppe gebunden ist, zu reagieren. Üblicherweise verwendet man eine stöchiometrische Menge oder ein Überschuß bis zu 250 Äquivalent Desaktivator auf ein Äquivalent Vernetzungsmittel. Nach der Zugabe des Desaktivators wird das Reaktionsgemisch weitere 18 bis 24 Stunden bei vermindelter Temperatur gerührt. Das rohe Reaktionsgemisch wird durch Zentrifugieren geklärt und gegen eine isotonische Elektrolytlösung dialysiert. Das erhaltene lösliche Polyhämoglobin wird sterilisiert durch Filtrieren durch einen Filter mit einer Porengröße von ungefähr 0,2 bis ungefähr 0,45  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 0,22  $\mu\text{m}$ .

Die für die erfindungsgemäßen Zwecke geeigneten polyfunktionellen Vernetzungsmittel sind vorzugsweise wasserlöslich und reagieren mit vernetzbaren Stellen von Hämoglobin unter Bildung eines vernetzten wasserlöslichen Produktes. Die angewandten Vernetzungsmittel üben keinen nachteiligen Effekt auf das Hämoglobin, dessen Löslichkeit oder seine Fähigkeit, reversibel Sauerstoff zu binden und zu den Geweben und Organen zu transportieren, aus. Die polyfunktionellen Vernetzungs-

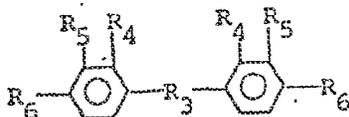
2607706

mittel besitzen zumindest zwei funktionelle Gruppen, die gleich oder verschieden sein können. Diese Gruppen sind imstande, mit Aminogruppen und anderen vernetzbaren Stellen des Hämoglobinmoleküls zu reagieren und sie zu vernetzen. Unter Aminogruppen sind die N-endständigen  $\epsilon$ -Aminogruppen der Hämoglobinketten und der basischen Aminosäurereste wie Lysin und Arginin zu verstehen. Die funktionellen Gruppen des Vernetzungsmittels können kovalent miteinander verbunden sein oder sie können durch eine aliphatische Gruppe oder einen aromatischen Ring voneinander getrennt sein. Beispiele für aromatisch stabilisierte funktionelle Gruppen sind mit einer Nitrogruppe aktivierte Azo- und Halogengruppen. Diese umfassen Verbindungen mit einem heterocyclischen Ring mit reaktionsfähigen Gruppen an dem Ring wie Triazine der Formel



wobei R<sub>1</sub> ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 und R<sub>2</sub> ein nukleophiler Substituent wie eine aliphatische Gruppe (z.B. Alkylgruppe mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen) oder aromatische Gruppe, ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 oder eine Aminogruppe ist. Vernetzungsmittel dieser Formel sind z.B. 2-Amino-4,6-dichlor-s-triazin und Chlor-s-triazin.

Geeignete Vernetzungsmittel umfassen auch aromatisch stabilisierte Verbindungen der Formel



in der R<sub>3</sub> eine kovalente Bindung, eine Alkylengruppe mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, eine Phenyl-, Oxy-, Sulfonyl- oder sek-Aminogruppe, R<sub>4</sub> ein Halogenatom oder eine Nitrogruppe, R<sub>5</sub> ein Wasserstoffatom, eine Nitrogruppe, eine

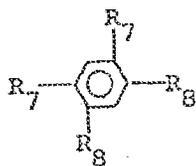
ORIGINAL INSPECTED  
.. / 9

609837/0973

2607706

Alkylgruppe mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, eine Sulfo- oder Carbacylgruppe und  $R_6$  ein Halogenatom, eine Diazo-, Isocyanat- oder Isothiocyanatgruppe bedeuten. Beispielhafte Verbindungen dieser Formel sind Bis-diazobenzidin-2,2'-sulfonsäure, 4,4'-Difluor-3,3'-dinitrophenylsulfon und Diphenyl-4,4'-diisothiocyanat.

Andere geeignete Vernetzungsmittel umfassen Verbindungen der Formel

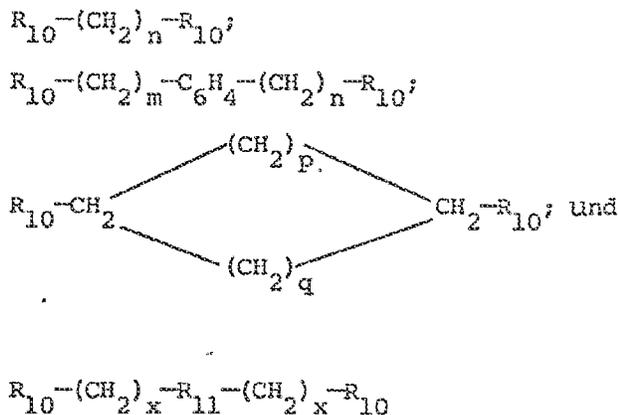


wobei  $R_7$  ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35,  $R_8$  eine Nitrogruppe oder ein Wasserstoffatom bedeuten, wobei mindestens ein Rest  $R_8$  eine Nitrogruppe ist.

Eine typische Verbindung hierfür ist 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol.

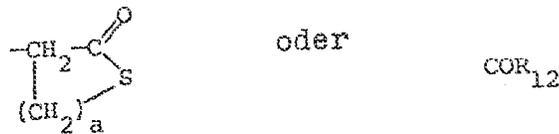
Weitere geeignete Vernetzungsmittel sind Verbindungen der Formel  $(R_9)_2C = O$ , wobei  $R_9$  ein Wasserstoff- oder Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 ist.

Weitere geeignete Vernetzungsmittel sind Verbindungen der Formeln



2607706

wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 8, m eine ganze Zahl von 0 bis 3, p eine ganze Zahl von 0 bis 4, q eine ganze Zahl von 1 bis 5, R<sub>10</sub> eine funktionelle Gruppe wie oben angegeben wie eine Isocyanat-, Vinyl-, Imino-, Isothiocyanat-, Isocyanid-, Aldehyd-, Epoxid-, Chlorformiat-, Trichlorformiat- oder Imidoalkylestergruppe oder eine Gruppe der Formel



wobei a eine ganze Zahl von 1 bis 3 und R<sub>12</sub> ein Halogenatom oder eine Azogruppe<sup>ist</sup> und R<sub>11</sub> eine Oxy-, Sulfonyl- oder zweiwertige Aminogruppe bedeutet.

Beispiele für handelsübliche Vernetzungsmittel der oben angegebenen Formeln sind Divinyl-sulfon, Epichlorhydrin, Butadien-dieoxid, Äthylen-glykol-diglycidyläther, Glycerin-diglycidyl-äther, Dimethyl-suberimidat-dihydrochlorid, Dimethyl-malonimidat-dihydrochlorid und Dimethyl-adipimidat-dihydrochlorid.

Typische Vernetzungsmittel mit einer Isocyanat- oder Isothiocyanatgruppe sind Diphenyl-4,4'-diisothiocyanat-2,2'-disulfonsäure, Toluol-diisocyanat, Toluol-2-isocyanat-4-isothiocyanat, 3-Methoxy-diphenylmethan-4,4'-diisocyanat, Propylen-diisocyanat, Butylen-diisocyanat und Hexamethylen-diisocyanat.

Beispiele für Vernetzungsmittel mit einer Aldehyd- oder Dialdehydgruppe sind Formaldehyd, Paraformaldehyd, mit Formaldehyd aktivierte Harnstoffe wie 1,3-Bis(hydroxymethyl)-harnstoff und N,N'-Di(hydroxymethyl)-imidazolidinon-gloxal, Malondialdehyd, Bernstein-dialdehyd, Glutaraldehyd, Adipin-

2607706

aldehyd, 3-Methyl-glutaraldehyd, Propyladipinaldehyd, Phthal-dialdehyd, Terephthaldehyd und Malondialdehyd.

Andere Vernetzungsmittel umfassen Derivate von Carbon-säuren und Carbonsäureresten von in situ aktiviertem Hämoglobin unter Bildung eines reaktionsfähigen Derivats von Hämoglobin, das mit den Aminen eines anderen Hämoglobinmoleküls vernetzt. Typische Carbonsäuren, die für diesen Zweck geeignet sind, besitzen die Formel  $\text{CO}_2\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$  oder  $\text{[(CH}_2)_n\text{COOH]}_3\text{CH}$ , in denen n 1 bis 8 ist. Derartige Carbonsäuren umfassen Citronen-, Malon-, Adipin- und Bernsteinsäure. Carbonsäureaktivatoren umfassen Thionylchlorid, Carbodiimide, N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat (Woodward's Reagens K), N,N'-Carbonyldiimidazol, N-tert.-Butyl-5-methylisoxazolium-perchlorat (Woodward's Reagens L), 1-Äthyl-3-dimethyl-amino-propylcarbodiimid, 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinäthyl)-carbo-diimid-metho-p-toluol-sulfonat.

Das Vernetzungsmittel kann auch eine Dialdehydvorstufe sein, die leicht einen bifunktionellen Dialdehyd in dem Reaktionsmedium bildet. Geeignete Dialdehydvorstufen umfassen: Acroleindimer oder 3,4-Dihydro-1,2-pyran-2-carboxaldehyd, bei dem im wässrigen Medium Ringspaltung eintritt unter Bildung von  $\alpha$ -Hydroxy-adipinaldehyd. Andere Vorstufen, die bei Hydrolyse ein Vernetzungsmittel bilden, sind u.a. 2-Äthoxy-3,4-dihydro-1,2-pyran, das Glutaraldehyd ergibt, 2-Äthoxy-4-methyl-3,4-dihydro-1,2-pyran, das 3-Methyl-glutaraldehyd ergibt, 2,5-Diäthoxy-tetrahydrofuran, das Bernsteindialdehyd ergibt, und 1,1,3,3-Tetraäthoxypropan, das Malondialdehyd ergibt und Formaldehyd aus Trioxan.

Der Vernetzungsmittel-Desaktivator, der zu dem Polymerisationsgemisch zugegeben wird, um die Reaktion abubrechen, (oder gegebenenfalls, wenn er zu Beginn zugegeben wird, zur Regulierung der Vernetzungsreaktion), ist ein mono-, di- oder

.. /12

2607706

multifunktionelles Reagenz, vorzugsweise ein primäres Amin der Formel  $R-NH_2$ . Das Amin sollte wasserlöslich sein, um dazu beizutragen, die Löslichkeitseigenschaften des polymerisierten Hämoglobins aufrechtzuerhalten. Typische niedermolekulare Amine, die angewandt werden können, sind Glycin, Lysin, Serin, Threonin, Alanin, Äthanolamin, 2-Aminoadipinsäure und Glutathion. Andere Verbindungen, die geeignet sind, die Vernetzungsmittel zu deaktivieren sind Abbruchmittel wie Bisulfite und Diole, die imstande sind, Aldehyde zu deaktivieren, niedermolekulare Alkohole zur Desaktivierung von aktivierten Carbonsäuren, aktivierte Halogenide und Isocyanate und Sulfhydryle zur Desaktivierung von Epoxiden und Vinylen.

Die Erfindung wird durch die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele, näher erläutert.

#### Beispiel 1

##### Herstellung der Hämoglobinlösung:

Das Ausgangsmaterial waren 5 Einheiten überaltertes menschliches Blut, enthaltend saure Citrat-Dextrose-Lösung als Antikoagulant. Das Blut wurde von einer lokalen Blutbank erhalten. Zunächst wurde das Blut aus den Gefäßen der Blutbank in autoklavierten 500 ml Centrifugengefäße gegeben. Die Gefäße wurden mit einer Kappe verschlossen und das Blut, bestehend aus Erythrocyten, Leukocyten, Blutplättchen und Plasma mit 5000 UpM (4000g), 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dann wurden das Plasma, der Leukocytenfilm und die Blutplättchen durch Absaugen durch eine sterile Pipette entfernt und verworfen. Die sedimentierten Erythrocyten, die zurückblieben, wurden viermal durch Suspendieren in ungefähr dem dreifachen ihres Volumens eiskalter steriler 0,9 %iger physiologischer Salzlösung oder 1,6 %iger Natriumchloridlösung gewaschen. Nach jedem Waschen wurden die Zellen wieder durch Zentrifugieren sedimentiert und die überstehende Flüssigkeit entfernt und verworfen.

2607706

Anschließend wurden die gewaschenen roten Zellen entweder mit einem gleichen Volumen von eiskaltem Wasser oder hypertoni-scher, 0,05 m Phosphatpufferlösung, pH 7,2, lysiert, um die intakten Zellwände aufzubrechen und das Hämoglobin freizusetzen. Die Lyse wurde durch 1 bis 2 Minuten langes heftiges Schütteln der Zell-Wasser-Suspension bei Raumtemperatur vervollständigt. Dann wurden die lysierten Zellen in einen sterilen 2-Liter-Scheidetrichter gegeben, wobei das gesamte Volumen der Lösung ungefähr 1500 ml betrug. Das lysierte Erythrocyten-Wasser-Gemisch wurde durch Extraktion mit 350 ml eiskaltem Toluol für Reagenzzwecke von Stroma befreit. Die Extraktion wurde durchgeführt durch zumindest fünf Minuten langes Schütteln in dem Scheidetrichter.

Nach dem Stehen bei 4°C über Nacht trennte sich das Extraktionsgemisch in drei Schichten: Eine obere Schicht aus Toluol, enthaltend Stroma und Lipide, eine mittlere Schicht von Zelltrümmern und eine untere Schicht aus der dunkelroten wäßrigen Hämoglobinlösung. Die untere Hämoglobinschicht, 800 bis 1200 ml, wurde abgetrennt und mit 19 000 UpM. (50 000g), 60 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die noch verbleibenden Zelltrümmer zu sedimentieren. Wenn nach dem Extrahieren mit Toluol keine Trennung der Schichten eintritt, wird die Toluol-Wasser-Zellemulsion entweder durch Zentrifugieren mit 5000 UpM. (4000g) 30 Minuten bei 4°C oder durch Behandeln der Emulsion mit 0,15 Volumina Celite<sup>®</sup>-535 Filterhilfe, einem Diatomeen-erdefilter, aufgebrochen. Die wäßrige Hämoglobinlösung wird vor dem Celite<sup>®</sup> durch Vakuumfiltration und Zentrifugieren mit 19 000 UpM (50 000g) entfernt. Etwaige letzte Spuren von Stroma in dem Hämoglobin wurden entweder durch Filtrieren durch Fil-ter mit einer Porengröße von 0,22 µm oder durch Durchleiten durch eine 3,8 cm (1,5 inch) dicke Schicht naßgepackter Celite<sup>®</sup>-535 Filterhilfe, die vorher sauer und anschließend mit sterilem pyrogenfreiem Wasser gewaschen worden war, ent-fernt.

../14

609837/0973

2607706

Anschließend wurde die frisch hergestellte stromafreie Hämoglobinlösung gegen 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7,6 mit Hilfe eines Dow Biofiber<sup>®</sup> -50 Miniplant-Dialysator dialysiert. Die semipermeablen hohlen Zellulosefasern des Dialysators wurden zunächst mit 2,5 % Formalin gewaschen und dann mit sterilem pyrogenfreiem Wasser gespült, um eine mögliche Verunreinigung des Hämoglobins durch Bakterien zu vermeiden. Die Aussenseite der Dialysehohlfasern wurde mit sterilem Wasser und sterilem Phosphatpuffer gespült. Dann wurde die Hämoglobinlösung mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min durch die Fasern geleitet, während der Puffer außen um die Fasern geleitet wurde und der Fluß des Puffers gegen die Fließrichtung des Hämoglobins mit einer Geschwindigkeit von 100 ml/min stattfand. Die Hämoglobinlösung wurde wiederholt durch die Fasern geleitet, zumindest dreimal, um einen vollständigen Elektrolytaustausch und Entfernung von zellulären Kaliumionen sicherzustellen. Die Hämoglobinlösung wurde weiter geklärt und sterilisiert durch Druckfiltration durch ein 0,22  $\mu$ m Filter, bestehend aus gemischten Estern von Zellulose der Millipore Corporation. Die stromafreie Hämoglobinlösung wurde durch Zutropfen von ungefähr 1 ml eiskalter gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu 1 ml Hämoglobinlösung unter konstantem Rühren untersucht, ob sie stromafrei war. Wenn kein Niederschlag auftritt, ist die Lösung stromafrei. Die Hämoglobinlösung wurde bis zum Verbrauch bei 4 bis 6°C gelagert.

Die Hämoglobinlösung wurde analysiert, um die Menge an Methämoglobin und Gesamthämoglobin in der Zubereitung zu bestimmen. In Oxyhämoglobin ist das Eisen der Hämgruppe zweiwertig. Wenn Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert wird, liegt das Eisen in dreiwertigem Zustand vor. Da Methämoglobin nicht imstande ist, Liganden wie CO, O<sub>2</sub> und NO zu transportieren, ist sein Vorhandensein in wesentlichen Mengen in der Hämoglobinzubereitung unerwünscht. Das Vorhandensein von Methämoglobin wurde spektrophotometrisch nach dem modifizierten Cyanomethämoglobinverfahren bestimmt, (Hawk's Physiological Chemistry, Seite 1096, 1968). Die Konzentrationen an Häm-

609837/0973

../15

2607706

globin und Methämoglobin in der Hämoglobinlösung wurden folgendermaßen bestimmt: Zunächst wurde die Hämoglobinlösung auf eine Konzentration von ungefähr 10 mg/ml verdünnt (Lösung A) und die Absorption der Lösung bei 630 nm gegen Wasser bestimmt ( $L_1$ ). Ein Tropfen einer KCN-Lösung (1 Teil 10 % KCN und 1 Teil 0,05 m Phosphat, pH 7,6) wurde zugegeben und die Lösung gemischt. Durch diese Zugabe wird gegebenenfalls vorhandenes Methämoglobin in Cyanomethämoglobin umgewandelt. Nach zwei Minuten wird die Absorption der Lösung bei 630 nm gegen destilliertes Wasser erneut abgelesen ( $L_2$ ). Cyanomethämoglobin absorbiert nicht bei 630 nm. Dann wird 1 ml der Lösung A mit 9 ml destilliertem Wasser verdünnt. Ein Tropfen 20 %iges Kaliumferricyanid wird zugegeben und nach zwei Minuten ein Tropfen von 10 %igem KCN. Die Lösung wird gemischt und die Absorption bei 540 nm gegen eine Blindprobe, bestehend aus 10 ml Wasser, enthaltend je einen Tropfen 20 %iges Kaliumferricyanid und 10 %iges KCN, abgelesen ( $L_3$ ). Die Konzentration von Methämoglobin und Hämoglobin wird folgendermaßen berechnet:

Konzentration von Methämoglobin (mM) =  $\frac{L_1 - L_2}{3,7}$  x Verdünnungsfaktor der Lösung A, ( $\epsilon_{\text{mM}}=3,7$  für Methämoglobin bei 630 nm).

Gesamtkonzentration von Hämoglobin (mM) =  $\frac{L_3}{11,0}$  x Verdünnungsfaktor der Lösung A x 10 ( $\epsilon_{\text{mM}}=11,0$  für Cyanomethämoglobin bei 540 nm). Die Ergebnisse für frisch hergestelltes Hämoglobin waren 0 bis 0,3 % (Gew./Vol.) Methämoglobin, während die Gesamthämoglobinkonzentration üblicherweise 13 bis 14 % (Gew./Vol.) oder 130 bis 140 mg Hämoglobin/ml betrug.

Die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin zur Bestimmung des millimolaren Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge maximaler Absorption wurde durchgeführt durch Umsetzung von Hämoglobin mit Kaliumferricyanid, wobei die zuletzt genannte Verbindung in einem 5 %igen Überschuß, bezogen auf Hämäquivalent vorhanden war. Ein etwaiger Überschuß an niedermolekularen Reagenzien wurde entfernt durch Dialyse gegen 0,2 m Phosphatpuffer, pH 6,8, und anschließende Dialyse gegen glasdestilliertes Wasser nach dem in Science, Band 144, Seite 68, 1968 angegebenen Verfahren.

../16

609837/0973

2607706

Zur Bestimmung der millimolaren Extinktionskoeffizienten wurde der Eisengehalt der Probe bestimmt durch Atomabsorbti-  
onspektroskopie nach dem in Am. J. Clin.Path., Band 48, Seiten  
225 bis 228, 1967, angegebenen Verfahren und der in The Physiolo-  
gist, Band 15, Seite 138, 1972, angegebenen Modifizierung. Ent-  
sprechend der Modifizierung wird eine 0,007 %ige Lösung von  
Albumin zu dem Vergleichseisenstandard zugegeben, um die  
Proteinkonzentration in den Standards und Proben anzugleichen.

Aus der Absorbti-  
on der Lösung bei einer Wellenlänge  
maximaler Absorbti-  
on,  $\lambda$ , und dem Eisengehalt der Probe werden  
die Extinktionskoeffizienten nach der folgenden Formel berech-  
net:

$$\xi = \frac{\text{Absorbti-  
on bei } \lambda_{\text{max}}}{\text{Mol Fe}}$$

Mit Hilfe des angegebenen Verfahrens ergab das nach Beispiel 1  
hergestellte Hämoglobin, wenn es zu Methämoglobin oxidiert wor-  
den war,  $\xi = 3,7 \times 10^3$  bei 630 nm und wenn Cyanid zugegeben  
worden war  $\xi = 11,1 \times 10^3$  bei 540 nm. Die spektralen Eigen-  
schaften von Hämoglobin und Polyhämoglobin sowohl in Form von  
Methämoglobin als auch von Cyanomethämoglobin sind in Tabelle 2  
angegeben.

#### Beispiel 2

Umsetzung von Dioxyhämoglobin mit Glutaraldehyd

In einen 1-Liter-Kolben, der mit Argon bei ungefähr 4°C  
äquibriert war, wurden unter Luftausschluß 250 ml Deoxyhäm-  
oglobinlösung, 14,2 % (Gew./Vol.) in 0,05 m Phosphatpuffer mit  
einem pH-Wert von 7,1 und einem Methämoglobingehalt von weniger  
als 0,3 % (Gew./Vol.) zugegeben. Die Lösung wurde durch kontinu-  
ierliches Spülen mit Stickstoff frei von Luft gehalten. Dann  
wurden 4,65 ml einer 1,3 m Lysinmonohydrochloridlösung in von  
Luft befreitem 0,05 m Phosphatpuffer zugegeben und die Lösung  
18 Stunden mit Stickstoff äquibriert, um möglicherweise noch  
vorhandene Spuren von Luft zu entfernen.

2607706

Anschließend wurden 5 ml 25 %igen wäßrigen Glutaraldehyds auf 125 ml mit von Sauerstoff befreitem 0,05 m Phosphatpuffer verdünnt, um eine 0,1 m Glutaraldehydlösung, pH 7,6, zu erhalten. 121 ml dieser Lösung wurden zu der Deoxyhämoglobin-Lysin-Lösung zugegeben. Die entstehende Lösung wurde 3 bis 18 Stunden unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen gerührt, um eine Vernetzung des Deoxyhämoglobins sicherzustellen. Die Vernetzungsreaktion wurde abgebrochen durch Zugabe von 46,5 ml von Luft befreiter Lysinlösung, 1,3 m, und die Lösung wurde weitere 18 Stunden gerührt.

Nach dem Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit 100 %igem Sauerstoff oxidiert und die Lösung geklärt durch Zentrifugieren und Filtrieren durch ein 0,65  $\mu$ m Millipore<sup>®</sup> Filter. Diese und die folgenden Stufen wurden so durchgeführt, daß die Temperatur der Lösung nicht über 15°C steigen konnte. Die geklärte Lösung wurde gegen eine geeignete Elektrolytlösung dialysiert, um nicht gebundenen Glutaraldehyd und überschüssiges Lysin zu entfernen. Das Gesamtvolumen nach der Dialyse betrug 350 ml mit einem pH-Wert von 6,77 bei 37°C in normaler physiologischer Salzlösung.

Gegebenenfalls können Kationen und andere Komponenten in dieser Verfahrensstufe zu der Polyhämoglobinlösung zugegeben werden. Auch kann der pH-Wert auf den Wert der Umgebung gebracht werden, bei der das Produkt angewandt werden soll, und die Lösung kann durch Filtrieren durch eine Autoklaven Filtrationseinheit, fassend ein Filter mit einer Porengröße von ungefähr 0,22  $\mu$ m, sterilisiert werden.

Die Spektralanalyse der Lösung im ultravioletten und sichtbaren Bereich ergab die in Figur 1 gezeigte Absorptionskurve. Die Spektralanalyse des durch Äquilibrieren der Lösung mit Stickstoff erhaltenen deoxygenierten polymerisierten Hämoglobins ergab die in Figur 2 angegebene Kurve. Die molaren Extinktionskoeffizienten für Polymethämoglobin und Polycyano-

2607706

methämoglobin, die erhalten worden waren durch Oxidation von Polyhämoglobin mit Kaliumferricyanid entsprechend Beispiel 1, wurden bestimmt und die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angegeben.

Die Bestimmung der intermolekularen Vernetzung zwischen Hämoglobintetrameren wurde durchgeführt durch Gelfiltration mit Hilfe eines biologisch inerten Polyacrylamids mit einer Molekulargewichtsausschlußgrenze von 150000 Dalton. Das eluierte Material wurde bei 546 nm beobachtet. Das Elutionsprofil zeigte, daß die angewandten Reaktionsbedingungen über 90 % makromolekulares Hämoglobin ergaben, da der überwiegende Teil (>90 %) des eluierten Proteins von den Gelporen zurückgehalten wurde. Das Polyacrylamidgel ist im Handel erhältlich als Bio-Gel<sup>(R)</sup> P-150 der Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA.

Ein weiterer Hinweis auf die Vernetzung wurde durch Dodecylsulfat-Polyacrylamid-gel-Elektrophorese erhalten. Das angewandte Verfahren ist beschrieben in J. Biol. Chem, Band 244, Seiten 4406 bis 4412, 1969. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte, daß Deoxyhämoglobin, das mit Glutaraldehyd polymerisiert war, aus kovalent vernetzten Aggregaten bestand mit Molekulargewichten entsprechend einem ganzzahligen vielfachen des Monomers,  $1 < n < 8$ .

Das Molekulargewicht des polymerisierten Hämoglobins wurde bestimmt durch Geldurchdringungschromatographie. Verfahren für Molekulargewichtsbestimmungen sind beschrieben in Biochem. Biophys. Acta, Band 79, Seiten 393 bis 406, 1964.

Die Geldurchdringung durch Agarosegel wurde zur Molekulargewichtsbestimmung angewandt. Das Agarosegel besitzt eine Molekulargewichtsausschlußgrenze von  $20 \times 10^6$  Dalton.

.. / 19

2607706

Die kugelförmigen Agarosegelperlen sind erhältlich als Sepharose <sup>®</sup> 4-B von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden. Beim Eluieren durch eine Säule, die mit Globularproteinen geeicht war, erhielt man das zahlenmäßige Molekulargewichtsmittel,  $\bar{M}_N$ , das Gewichtsmittel des Molekulargewichts,  $\bar{M}_W$ , und den Grad der Polymerisation, D.P., für das polymerisierte Hämoglobin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angegeben.

Eine weitere Charakterisierung des Polyhämoglobins wurde erreicht durch Messung der Viskosität und Osmolarität. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Viskosität für mit Glutaraldehyd vernetztes Deoxyhämoglobin im Vergleich zu Hämoglobin sowie ein Newton'sches Verhalten, was die Unabhängigkeit der Viskosität von der Scherkraft zeigt. Dieses Polymer zeigte eine starke Zunahme der relativen Viskosität mit der Konzentration, wie aus Figur 4 hervorgeht und durch die die Kreise verbindende Kurve angegeben ist. Die Viskositätsdaten wurden mit einem Ostwald-Viskosimeter Nr. 25 bei 37°C nach der ASTM-Bestimmung D2162-64 erhalten. Die Osmolarität wurde mit einem Dampfdruckosmometer, Model 302B der Hewlett Packard, bestimmt, das mit Hilfe der modernen

Gefrierpunktsstandards NaCl geeicht war. Die polymerisierten Hämoglobinlösungen in einem physiologisch geeigneten Träger waren alle iso-osmotisch, 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O ( $\pm 10\%$ ) mit einer Intrinsic-Viskosität  $[\eta] = 0,091$  dl/g.

Der Grad der kationischen Bindung an Polyhämoglobin wurde bestimmt durch Zugabe von entweder Calcium- oder Magnesiumionen zu der Lösung. Die Proben wurden 15 Minuten bis 18 Stunden bei 4°C inkubiert und das makromolekulare Hämoglobin von dem Lösungsmittel abgetrennt durch Zentrifugieren durch einen Membranultrafilter mit einer Rückhaltgrenze für ein Molekulargewicht von 50 000. Diese Ultrafilter sind unter dem Namen Centriflo <sup>®</sup> Membrane Ultrafilters der Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts USA im Handel.

2607706

Das klare Filtrat wurde auf den Calcium- oder Magnesiumgehalt untersucht mit Hilfe von Calcium Rapid Stat<sup>®</sup> und Magnesium Rapid Stat<sup>®</sup> der Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USA. Die Ergebnisse zeigten keine Bindung von Calcium- oder Magnesiumionen an das Polyhämoglobin.

Die Sterilität der Lösungen wurde nach Standardverfahren für flüssige Medien USP XVIII, Seiten 856 bis 865, 1970, bestimmt. Alle Proben, die durch ein 0,22  $\mu$ m Filter filtriert worden waren, erwiesen sich als steril.

Die Analyse des polymerisierten Hämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8 % (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,6 % (Gew./Vol.), was zeigt, daß das Hämoglobineisen im zweiwertigen Zustand verblieben ist. Die Sauerstoffbindungs-fähigkeit wurde in einer Van Slyke-Vorrichtung nach dem in J. Biol. Chem. Band 61, Seiten 523 bis 573, 1924, angegebenen Verfahren bestimmt und es zeigte sich, daß sie nahe bei 100 % lag. Die Sauerstoffaffinität des makromolekularen Hämoglobins, gemessen als Teildruck Sauerstoff, der erforderlich ist, um die Polyhämoglobinlösung zur Hälfte zu sättigen, wurde zu 22 mm<sup>Hg</sup> Sauerstoffdruck oder  $P_{50} = 22$  mm Hg bei Atmosphärendruck und 37°C bei einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,1 gefunden. Die Sauerstoff-Dissoziationskurve ist in Figur 3 angegeben. Die Sauerstoff-Dissoziationskurven von Hämoglobin und dessen Derivaten werden bestimmt, indem man zunächst eine Hämoglobinprobe durch Tonometrie mit einem Gasgemisch bekannter Zusammensetzung äquilibriert und dann die äquilibrierte Probe spektrophotometrisch mißt. Die Sauerstoffdissoziationskurven für Hämoglobin und dessen Derivate werden auch bestimmt, indem man tonometriertes Hämoglobin verwendet und es in einer Sauerstoffsättigungsmeßvorrichtung (Oxygen Saturationmeter) photometrisch mißt. Das für diese Bestimmungen angewandte Verfahren und Tonometer sind beschrieben in Pflügers Archiv, Band 15, Seiten 418 bis 424, 1960; Operators

.. / 21

609837/0973

2607706

Manual - 137 Tonometer, Seiten 1 bis 14 und 37 bis 42, 1965, veröffentlicht von Instrumentation Laboratory, Inc., Lexington, Massachusetts, USA; und J. Appl. Physiol., Band 28, Seiten 227 bis 233, 1970. Die Sauerstoff-Sättigungsverfahren sind bekannt (Scan. J. Clin. Lab. Inv. Band 14, Seiten 587 bis 597, 1962).

### Beispiel 3

#### Reaktion von Oxyhämoglobin mit Glutaraldehyd

Die Polymerisation von Oxyhämoglobin mit Glutaraldehyd wurde durchgeführt, indem man das Verfahren des Beispiels 2 mit allen dort angegebenen Bedingungen wiederholte mit der Ausnahme, daß die Lösungen und die Reaktionsumgebung Sauerstoff enthielten (are kept aerobic) durch Äquilibrieren entweder mit Luft oder mit 100 %igem  $O_2$ . Gegebenenfalls kann die polymerisierte Oxyhämoglobinlösung durch Filtrieren durch einen 0,45  $\mu$ m Filter sterilisiert werden.

Die Bestimmung der intermolekularen Vernetzung wurde durch Gelfiltration, wie in Beispiel 2 angegeben, durchgeführt und das entstehende Elutionsprofil zeigte, daß die Reaktion zu 90 % makromolekularem Hämoglobin geführt hatte. Die Ergebnisse der Molekulargewichtsanalyse sind in Tabelle 1 angegeben. Die makromolekulare Oxyhämoglobinlösung war iso-osmotisch, 300 mOsm/kg  $H_2O$  ( $\pm 10$  %) mit einer Intrinsic-Viskosität ( $\eta$ ) = 0,110 dl/g. Dieses Polymer zeigte eine starke Zunahme der relativen Viskosität mit der Konzentration, wie in Figur 4 durch die die Dreiecke verbindende Kurve angegeben ist.

Die Analyse des Polyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin zeigte eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8 % (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,6 % (Gew./Vol.) Die Sauerstoffaufnahme-fähigkeit wurde zu nahe 100 % gefunden, der  $P_{50}$ -Wert war 4 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und  $37^\circ C$  mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,1 und einer Sauerstoffdissoziationskurve wie in Figur 5 angegeben.

2607706

Beispiel 4

Umsetzung von Deoxyhämoglobin mit Divinylsulfon

In einen 1-Liter-Kolben, der mit Argon bei ungefähr 4°C äquili-  
briert war, wurden unter Luftausschluß 250 ml Deoxyhämoglobin-  
lösung 14 % (Gew./Vol.) in 0,05 m Phosphatpuffer mit einem pH-  
Wert von 7,1 und einem Methämoglobingehalt von weniger als  
0,3 % (Gew./Vol.) gegeben. Die Lösung wurde durch kontinuierliches  
Spülen mit feuchtem Stickstoff frei von Luft gehalten. Die Deoxy-  
hämoglobinslösung wurde dann 18 Stunden mit Stickstoff äquili-  
briert, um möglicherweise noch vorhandene Luftverunreinigungen  
zu entfernen.

Anschließend wurden 115 mg (0,85 ml) Divinylsulfon zuge-  
geben und die Reaktionslösung 72 bis 96 Stunden bei 4°C gerührt.  
Alle 24 Stunden wurde der pH-Wert eines kleinen Anteils von un-  
gefähr 0,5 cm<sup>3</sup> der Reaktionslösung bestimmt und das Fortschrei-  
ten der Reaktion durch Gelfiltration durch Bio-Gel<sup>®</sup> P-150, wie  
oben beschrieben, bestimmt. Wenn notwendig, wurde der pH-Wert mit  
1nNaOH auf ungefähr 7,2 bis 7,4 eingestellt. Wenn die Gelfiltra-  
tion zeigte, daß ungefähr 80 bis 90 % des roten Materials außer-  
halb des Gels blieben, d.h.  $M_w > 150\ 000$  Dalton, wurde die Reak-  
tion durch Zugabe von 30 ml von Luftbefreiter 1,3 m Lysinlösung  
zur Desaktivierung nicht umgesetzter Vinylgruppen abgebrochen.  
Dann wurde die Reaktionslösung weitere 18 Stunden unter Luftaus-  
schluß gehalten und gerührt.

Nach dem Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung  
mit 100 %igem Sauerstoff oxidiert und die Lösung durch Zentrifu-  
gieren und Filtern durch einen 0,65 µm Millipore<sup>®</sup>-Filter ge-  
klärt. Diese Stufen und alle folgenden Stufen wurden durchge-  
führt, ohne daß die Temperatur über 15°C steigen konnte. Die ge-  
klärte Lösung wurde dann gegen einen Elektrolyten dialysiert, um  
nicht gebundenes Divinylsulfon und überschüssiges Lysin zu ent-  
fernen. Das Gesamtvolumen nach der Dialyse betrug 280 ml mit  
einem pH-Wert von 6,92 bei 37°C in physiologischer Salzlösung.  
Die makromolekulare Hämoglobinslösung wurde mit einem physiolo-  
gisch geeigneten Träger vermischt, der pH-Wert auf einen

2607706

physiologisch geeigneten Bereich eingestellt, wie in Beispiel 2 beschrieben, und die Lösung durch Filtrieren durch einen Millipore <sup>®</sup> Filter mit einer Porengröße von 0,22  $\mu$ m sterilisiert.

Die prozentuale Umwandlung von Hämoglobin zu makromolekularem Hämoglobin wurde durch Gelfiltration bestimmt und die kovalente Vernetzung wurde nachgewiesen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat, wie in Beispiel 2 beschrieben. Ähnliche Ergebnisse wurden für Deoxyhämoglobin, das mit Divinylsulfon vernetzt war, gefunden wie für mit Glutaraldehyd vernetztes Deoxyhämoglobin, wie in Beispiel 2 beschrieben. Die Spektralanalyse der oxidierten Lösung im ultravioletten und sichtbaren Bereich zeigte das in Figur 6 angegebene Spektrum. Die Analyse der durch Äquilibrieren mit Stickstoff deoxygenierten makromolekularen Hämoglobinlösung zeigte das in Figur 7 angegebene Spektrum. Die Ergebnisse der Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 2 angegeben.

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Geldurchdringungschromatographie und Viskositätsmethoden sind in Tabelle 1 angegeben. Die Polyhämoglobinlösung in einem physiologischen Träger war iso-osmotisch, 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O ( $\pm$  10%), mit einer Intrinsic-Viskosität  $[\eta] = 0,139$  dl/g. Die relative Viskosität war im wesentlichen unabhängig von der Konzentration, wie in Figur 4 angegeben, wobei dieses Polymer durch die Quadrate verbindende Kurve dargestellt ist. Die Analyse des makromolekularen Hämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8,5 % (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,4 % (Gew./Vol.). Es zeigte sich, daß die Sauerstoffaufnahme-fähigkeit nahezu 100 % betrug mit einem P<sub>50</sub>-Wert von 100 bis 120 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 6,9 und einer Sauerstoffdissoziationskurve wie in Figur 8 angegeben.

.. / 24

609837/0973

2607706

### Beispiel 5

#### Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Divinylsulfon

Die Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Divinylsulfon wurde entsprechend Beispiel 4 durchgeführt mit der Ausnahme, daß alle Lösungen und die die Reaktion umgebende Atmosphäre Luft enthielten durch Äquilibrieren entweder mit Luft oder mit 100 %igem  $O_2$ . Die bis zur vollständigen Reaktion erforderliche Zeit, wie sie durch Elution durch Bio-Gel <sup>®</sup> P-150 bestimmt wurde, betrug ungefähr 96 Stunden.

Die Umwandlung zu makromolekularem Hämoglobin wurde bestimmt durch Gelfiltration und die kovalente Vernetzung wurde nachgewiesen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Hilfe von Dodecylsulfat, entsprechend Beispiel 2. Es wurden ähnliche Ergebnisse für mit Divinylsulfon vernetztes Oxyhämoglobin erhalten wie für mit Glutaraldehyd oder Divinylsulfon vernetztes Deoxyhämoglobin wie in den Beispielen 2 und 4 beschrieben. Die Spektralanalyse der oxidierten Lösung im ultravioletten und sichtbaren Bereich zeigt das in Figur 9 angegebene Absorptionsspektrum. Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Geldurchdringungschromatographie und Viskositätsmethoden sind in Tabelle 1 angegeben. In Tabelle 2 sind die Extinktionskoeffizienten für Polyhämoglobin in Form von Methämoglobin und Cyanomethämoglobin angegeben.

Die Lösung von vernetztem Oxyhämoglobin in einem physiologischen Träger war iso-osmotisch, 300 mOsm/kg  $H_2O$  ( $\pm 10\%$ ) mit einer Intrinsic-Viskosität  $[\eta] = 0,061$  dl/g. Die relative Viskosität war im wesentlichen von der Konzentration unabhängig, wie aus der die Rauten verbindenden Kurve in Figur 4 hervorgeht. Die Untersuchung des makromolekularen Oxyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8,5 % (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,4 % (Gew./Vol.). Es zeigte sich, daß das Sauerstoffaufnahmevermögen nahezu 100 % betrug und der  $P_{50}$ -Wert 4 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und  $37^\circ C$  mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 6,9 und einer Sauerstoffdissoziationskurve wie in Figur 10 angegeben ist.

2607706

### Beispiel 6

Umsetzung von Deoxyhämoglobin mit Hexamethylendiisocyanat

In einen mit Argon äquilibrierten 100 ml-Rundkolben wurden bei 4°C unter Luftausschluß 20 ml Deoxyhämoglobinlösung, 12 % (Gew./Vol) in 0,05 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,1 gegeben und die Lösung durch kontinuierliches Spülen mit feuchtem Argon luftfrei gehalten. Die Lösung wurde ungefähr 18 Stunden zur Entfernung möglicher Luftverunreinigungen unter Rühren unter Stickstoff bei dieser Temperatur gehalten.

Anschließend wurden 0,138 ml Hexamethylendiisocyanat zu dem Deoxyhämoglobin zugegeben und die Reaktionsteilnehmer unter den oben beschriebenen Bedingungen 72 Stunden gerührt, um das Deoxyhämoglobin zu vernetzen. Etwaiges überschüssiges in dem Reaktionsgemisch verbliebenes Hexamethylendiisocyanat wurde durch Zugabe von 4 ml luftfreier 1,3 m Lysinlösung desaktiviert und anschließend 18 Stunden gerührt, um sicherzustellen, daß die Desaktivierung vollständig war. Die Lösung wurde oxidiert und durch Zentrifugieren geklärt.

Die Umwandlung zu polymerisiertem Hämoglobin wurde bestimmt durch Gelfiltration durch Biogel <sup>®</sup> P-150. Der Hauptteil des eluierten Produktes, 85 %, drang nicht in die Gelporen ein, was ein Proteinmolekulargewicht von mehr als 150 000 Dalton anzeigt. Die Untersuchung des polymerisierten Deoxyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 9,5 % (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,7 % (Gew./Vol.). Es zeigte sich, daß der  $P_{50}$ -Wert des polymerisierten Hämoglobins 3,5 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,1 war.

### Beispiel 7

Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Hexamethylendiisocyanat

Die Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Hexamethylendiisocyanat wurde entsprechend dem in Beispiel 6 angegebenen Verfahren durchge-

2607706

führt, wobei die gleichen Bedingungen angewandt wurden mit der Ausnahme, daß die Lösung und die die Reaktion umgebende Atmosphäre durch Äquilibrieren mit Luft oder Sauerstoff Luft enthielten. Die prozentuale Umwandlung zu polymerisiertem Oxyhämoglobin, wie sie durch Gelfiltration bestimmt wurde, ergab Werte, die mit den in Beispiel 6 erhaltenen übereinstimmten für eine Ausbeute von 85 % makromolekularem Oxyhämoglobin.

#### Beispiel 8

Umsetzung von Deoxyhämoglobin mit Dimethylsuberimidat-hydrochlorid

Die Vernetzung von Deoxyhämoglobin wurde folgendermaßen durchgeführt: In einen 50-cm<sup>3</sup>-Dreihals-Rundkolben, der mit Argon gespült und auf 5 bis 10°C gehalten worden war, wurden zunächst 20 ml Deoxyhämoglobin in einer Konzentration von 13 % (Gew./Vol.) in 0,25 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8,0 und einem Methämoglobingehalt von weniger als 0,3 % (Gew./Vol.) gegeben und anschließend 263 mg Dimethylsuberimidatdihydrochlorid in 4 ml von Luft befreiter gesättigte Natriumbicarbonatlösung. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wurde mit 1 n NaOH auf 8 eingestellt und durch Zugabe von 1 m NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf diesem Wert gehalten, bis er sich ungefähr 15 Minuten lang nicht mehr änderte. Der Kolben wurde mit Stopfen verschlossen und die Reaktion konnte eine Stunde bei 4°C unter Rühren ablaufen. Der Kolben wurde geöffnet und mit Luft äquilibriert. Die Reaktion wurde abgebrochen durch Zugabe von 2 ml 1,3 m Lysin, wobei das Gemisch weitere 3 Stunden gerührt wurde, um den Reaktionsabbruch sicherzustellen. Schließlich wurde die Lösung durch Zentrifugieren geklärt und anschließend gegen 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7,6, dialysiert.

Die Umwandlung zu polymerisiertem Hämoglobin wurde durch Gelfiltration durch Biogel<sup>®</sup> P-150 bestimmt. Der Hauptteil des eluierten Produktes (90 %) blieb außerhalb der Gelporen, was ein Molekulargewicht von über 150 000 Dalton anzeigt. Das makromolekulare Deoxyhämoglobin besaß auch eine Hämoglobin-

../27

609837/0973

2607706

konzentration von ungefähr 8 % und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,6 % (Gew./Vol.). Es zeigte sich, daß der  $P_{50}$ -Wert des polymerisierten Hämoglobins 2,5 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 20°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,35 betrug.

#### Beispiel 9

Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid

Die Vernetzung von Oxyhämoglobin mit Dimethylsuberimidat wurde entsprechend dem Verfahren des Beispiels 8 durchgeführt, wobei die gleichen Bedingungen angewandt wurden mit der Ausnahme, daß die Lösung und die Reaktionsatmosphäre durch Äquilibrieren mit Luft lufthaltig waren. Die physikalische Analyse des polymerisierten Oxyhämoglobins zeigte Ergebnisse, die mit dem vernetzten Deoxyhämoglobin des Beispiels 8 übereinstimmten. Der  $P_{50}$ -Wert betrug 2,5 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,45.

#### Beispiel 10

Polymerisation von Oxyhämoglobin mit Butadiendiepoxid

20 ml Oxyhämoglobinlösung, 13,4 % (Gew./Vol.), in 0,05 m Boratpuffer mit einem pH-Wert von 8,0 und einem Methämoglobingehalt von weniger als 0,5 % (Gew./Vol.) wurden in einen Kolben, enthaltend 320  $\mu$ l Butadiendiepoxid und 370  $\mu$ l Triäthylamin, beide in Form von reinen (neat) Lösungen, gegeben. Die Lösung wurde 96 Stunden unter Luft bei 5°C gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 500 mg festem Cystein abgebrochen. Der Feststoff wurde durch Rühren gelöst und 18 Stunden zur Reaktion gebracht. Die Analyse der intermolekularen Vernetzung wurde durch Gelfiltration durch Biogel <sup>®</sup>-P-150 durchgeführt. Der Hauptteil des eluierten Produktes, 85 %, blieb außerhalb des Gels, was ein Molekulargewicht von mehr als 150 000 Dalton angibt. Die Analyse des polymerisierten Oxyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 9,5 % und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,4 % (Gew./Vol.).

Tabelle 1

Molekulargewicht von polymerisiertem Hämoglobin

polymeri- siertes Hb	Verfahren*	$\bar{M}_w$ ( $\times 10^{-5}$ )	$\bar{M}_n$ ( $\times 10^{-5}$ )	D.P.	$\bar{M}_{\text{visk.}}$ ( $\times 10^{-5}$ )
Beispiel 2	1	5,3( $\pm 0,8$ )	0,9( $\pm 0,1$ )	5,6( $\pm 0,6$ )	---
	2	---	---	---	1,6
Beispiel 3	1	11,2( $\pm 1,1$ )	1,6( $\pm 0,3$ )	9,6( $\pm 1,8$ )	---
	2	---	---	---	1,8
Beispiel 4	1	5,9( $\pm 1,8$ )	1,1( $\pm 0,1$ )	6,8( $\pm 0,6$ )	---
	2	---	---	---	2,3
Beispiel 5	1	5,0( $\pm 1,4$ )	0,95( $\pm 0,1$ )	6,0( $\pm 0,6$ )	---
	2	---	---	---	1,0

\* angewandtes Verfahren

(1) GPC-Sepharose <sup>®</sup> 4B

(2) Viskosität

2607706

Tabelle 2Spektrale Eigenschaften von Hämoglobin und polymerisiertem Hämoglobin

<u>Beispiel</u>	<u>Hb oder Poly(Hb)<sub>n</sub></u>	<u>Form</u>	<u><math>\lambda</math></u>	<u><math>\epsilon \times 10^{-3}</math></u>
1	Hb	M	630	3,7
1	Hb	C	540	11,1
2	Poly(Hb) <sub>n</sub>	M	630	3,9
2	Poly(Hb) <sub>n</sub>	C	540	9,7
4	Poly	C	540	9,4
5	Poly	M	630	3,2
5	Poly	C	540	9,7

Dabei bedeutet Poly(Hb)<sub>n</sub> polymerisiertes Hämoglobin, M Methämoglobin, C Cyanomethämoglobin,  $\lambda$  die Wellenlänge und  $\epsilon$  den molaren Extinktionskoeffizienten.

2607706

Die erfindungsgemäßen vernetzten stromafreien Hämoglobine besitzen die Fähigkeit, sich mit einem Liganden wie Sauerstoff oder Kohlenmonoxid abzusättigen und diesen Liganden zu transportieren und an die Umgebung, wo er gebraucht wird, oder einen Ligandenrezeptor abzugeben. Diese Eigenschaft macht die Polyhämoglobine geeignet als Blutersatzstoffe. Das Polyhämoglobin ist löslich in wäßrigen Medien, Blut, Plasma, Kristalloidlösungen, gepufferten Elektrolytlösungen und kolloidalen Polymerlösungen. Das Polyhämoglobin besitzt physiologisch geeignete kolloid-osmotische Eigenschaften, die es als Blutplasma-Streckmittel geeignet machen. Polyhämoglobin besitzt eine verlängerte Plasma-Lebensdauer in vivo, wie aus einer Halbwertszeit von mehr als dem doppelten von nicht polymerisiertem Hämoglobin hervorgeht. Üblicherweise etwa 12 bis 30 Stunden. Außerdem werden, da das Polyhämoglobin stromafrei ist, schädliche Wirkungen auf das Nierensystem vermieden.

Die Fähigkeit des Polyhämoglobins, Sauerstoff an lebendes Gewebe und Organe von Tieren einschließlich Haustieren wie Hunden und Katzen und Kühen und Schweinen und anderen Säugetieren zu transportieren und zu liefern und verschiedene Liganden auszutauschen, wird durch die unten angegebenen Beispiele gezeigt. Der Ausdruck "im wesentlichen stromafrei", wie er in diesen Beispielen und der übrigen Beschreibung verwendet wird, bedeutet, daß das Polyhämoglobin kein Stromamaterial von roten Blutzellen einschließlich nicht-Hämoglobinproteine, Phospholipide und Lipide enthält. "Halbwertszeit" bedeutet die Zeit, in der eine ursprüngliche Polyhämoglobinmenge in vivo auf die Hälfte ihres anfänglichen Wertes absinkt. "Dissoziationskurve" gibt das Ausmaß<sup>an</sup> in dem Polyhämoglobin den Liganden, z.B. Sauerstoff, unter einer Ligandenspannung von 0 bis 140 mm Hg bindet bzw. enthält. "Sauerstoffbindungsvermögen" bedeutet den Teil in Prozent der Sauerstoffmenge, der sich mit jeder in Polyhämoglobin enthaltenen Hämgruppe verbinden kann. Zum Beispiel bedeutet eine Sauerstoffaufnahmefähigkeit von 100 %, daß jede in dem Polyhämoglobin enthaltene Hämgruppe das Maximum von einem Sauerstoffmolekül binden kann. "Sauerstoffaffinität" bedeutet den P<sub>50</sub>-Wert

2607706

von Polyhämoglobin, d. h. den Teildruck  $PO_2$  von Sauerstoff bei 50 %iger Sättigung. "Blutersatzstoff" bedeutet die Fähigkeit des Materials, Sauerstoff an lebendes Gewebe und Organe zu transportieren und zu liefern, und den intravaskulären(oncotic)-Druck aufrechtzuerhalten. "Plasma-Streckmittel" bedeutet die Fähigkeit von Polyhämoglobinlösungen, das Blutvolumen aufzufüllen.

#### Beispiel 11

Die Verweilzeit von Polyhämoglobin im Plasma wurde folgendermaßen gemessen:  
Zunächst wurde am Tag vor der Infusion ein Dauerkatheter in die Vena saphena im Hinterbein von zwei Hunden eingeführt und das Blutvolumen der Hunde nach Standardverfahren berechnet. Das berechnete Blutvolumen wurde auf das Gewicht des Hundes bezogen mit der Annahme, daß das Blutvolumen bei Hunden ungefähr 7 % des Gesamtkörpergewichts ausmacht. Dann wurden am nächsten Tag 20 % des Blutvolumens durch den Katheter abgezogen und sofort durch das gleiche Volumen Polyhämoglobin in einer Konzentration von 7 % in Ringer's Lösung ersetzt. Bei einem anderen Hund wurden 20 % des Blutvolumens durch das gleiche Volumen von ursprünglichem menschlichem Hämoglobin ersetzt. Ursprüngliches Hämoglobin ist isoliertes, nicht vernetztes Hämoglobin mit einer Konzentration von 7 % in Ringer's Lösung. Dann wurden von beiden Hunden in Intervallen von zwei Stunden Blutproben entnommen bis das Hämoglobin in dem Plasma abfiel wie durch Spektrophotometrie nach dem Cyanomethämoglobinverfahren, das in Beispiel 1 beschrieben ist, bestimmt wurde. Die Halbwertszeit von Polyhämoglobin und ursprünglichem<sup>+) Hämoglobin</sup> wurde durch eine halb-logarithmische Auftragung der Zeit gegen die Hämoglobinkonzentration in dem Plasma bestimmt, da dadurch eine etwaige exponentielle Abnahme auf eine lineare Abnahme zurückgeführt wird. Die gemessenen Ergebnisse zeigten, daß die nach den Beispielen 2 bis 5 hergestellten Polyhämoglobine eine 2- bis 8-fache Zunahme der Verweilzeit im Plasma, <sup>ergaben</sup> bezogen auf ursprüngliches Hämoglobin, das eine Halbwertszeit von 4 Stunden in dem Plasma eines Hundes hatte.

+) (nativem)

2607706

Beispiel 12

Die erhöhte Verweilzeit von Deoxyhämoglobin, das entsprechend Beispiel 2 mit Glutaraldehyd vernetzt war, und Hämoglobin wurde an männlichen Ratten gemessen, die 250 bis 300 g wogen und bei denen sich in einer Femor-Vene eine Kanüle zur Infusion befand und in einer Femor-Arterie eine Kanüle zur Entnahme von Proben, entsprechend dem Beispiel 11. Außerdem wurde das Blutvolumen der Ratte mit 8 % des Gesamtkörpergewichts berechnet und das Polyhämoglobin besaß eine Konzentration von 8 % in normaler Salzlösung. Die Blutproben, 0,3 ml wurden mit 500g zentrifugiert, um die Zellen abzusetzen. Das Plasma, enthaltend Polyhämoglobin, wurde nach der Cyanohämoglobin-Spektralmethode des Beispiels 1 auf die Polyhämoglobinkonzentration untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß Hämoglobin eine Halbwertszeit in dem Plasma von 90 Minuten besaß, während das Polyhämoglobin eine längere Halbwerts-Verweilzeit im Rattenplasma von 315 Minuten besaß.

Beispiel 13

Ein Blutaustausch (total perfusion) bei Ratten mit Polyhämoglobin wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurden übliche männliche weiße Laborratten mit einem Gewicht von 250 bis 300 g mit 40 mg/kg Natriumpentobarbital anaesthesiert. Dann wurden in beide Femor-Arterien und eine Femor-Vene Kanülen eingeführt und den Ratten Heparin zugeführt. Während der gesamten Untersuchung wurde der Druck der Hauptarterie der Raten kontinuierlich über eine Femor-Arterie notiert und durch die andere Arterie das Blut abgezogen. Die Femor-Vene wurde für die Infusion von Polyhämoglobin angewandt.

Der Anfangsanteil an Erythrozyten (Hämokrit) wurde bestimmt und 2 ml Blut abgezogen. Anschließend wurden 2 ml polymerisiertes Hämoglobin, das entsprechend Beispiel 2 hergestellt worden war, innerhalb von 2 bis 3 Minuten durch Infusion zugeführt. Dann in Intervallen von ungefähr 5 Minuten jeweils 1 ml Blut abgezogen und 1 ml Polyhämoglobin durch Infusion den Ratten zugeführt und der Blutaustausch fortgesetzt, bis das gesamte

das als 8 % des Körpergewichtes angenommen wurde, abgezogen worden war. Wenn die Tiere Anzeichen einer Schockreaktion zeigten, wie durch eine falsche Atmung oder einen abnehmenden arteriellen Druck angezeigt wurde, wurde die Zeit zwischen deren einzelnen Entnahmen verlängert, aber die Polyhämoglobininfusionsgeschwindigkeit von 1 ml alle 5 Minuten beibehalten, um die Tiere am Leben zu erhalten. Alle 15 bis 20 Minuten wurde ein Hämokrit bestimmt und die Blutentnahme und Infusion fortgesetzt bis der Hämokrit von 45 auf weniger als 5 % gefallen war. Während der gesamten Versuche erschien die Haut der Ratten normal und es schien kein Polyhämoglobin in die extrazellulären Flüssigkeiten auszutreten, wie es der Fall war, wenn das Blutvolumen ersetzt wurde durch eine nicht-polymerisierte Hämoglobinlösung in Glukose-Salzlösung. Die Ergebnisse zeigten, daß das Polyhämoglobin Sauerstoff an das Gewebe lieferte, ohne in die extrazellulären Flüssigkeiten zu diffundieren.

#### Beispiel 14

Die Fähigkeit von Polyhämoglobin, Sauerstoff an tierisches Gewebe zu liefern, wurde an einem isolierten mit Blut durchströmten Kaninchenherzseptum folgendermaßen nachgewiesen: Zunächst wurde das Herz eines anaesthesierten und heparinisierten Kaninchens entfernt und die Septum-Arterie mit einer Kanüle versehen und der äußere Muskel entfernt. Die Durchströmung mit Hunderythrozyten in einer Lösung von Glukose in physiologischer Salzlösung wurde begonnen, sobald das Herz aus dem Körper entfernt worden war, um eine mögliche Schädigung des Gewebes zu vermeiden. Dann wurde das Septum in den Rahmen gespannt, sodaß der Herzschlag und die Änderungsgeschwindigkeit der Spannung gemessen werden konnten. Der Sauerstoffverbrauch des Septums wurde variiert durch Änderung der Herzgeschwindigkeit, Durchströmungsgeschwindigkeit und Temperatur des Septums. Die Versuchsbedingungen, die zu einem maximalen Sauerstoffverbrauch des Septums führten, ohne daß der damit verbundene Verlust der Septumstabilität auftrat, wurden mit Hilfe von Hunderythrozyten als Durchströ-

.. / 34

2607706

mungsflüssigkeit bestimmt. Der arterielle und venöse Sauerstoffgehalt wurde mit Hilfe eines Standard-Sauerstoffmeßinstrumentes gemessen und die Änderung in der Hämoglobinsättigung von dem arteriellen zu dem venösen Blutstrom wurde mit Hilfe der in Beispiel 2 beschriebenen Vorrichtung zur Messung der Sauerstoffsättigung bestimmt.

Die Ergebnisse der Durchströmungsmessungen mit dem in den Beispielen 2 bis 5 angegebenen Polyhämoglobin zeigten, daß die Sauerstoffsättigung 50 bis 70 % und der Sauerstoffgehalt 3 Vol.-% zwischen der arteriellen und venösen Seite des Septums abnahm, was anzeigt, daß Polyhämoglobin in dem durchströmten in-vivo-System Sauerstoff an lebendes Gewebe liefert. Ein allgemeines Verfahren für die Perfusion in isolierten Septa ist beschrieben in J. General Physiology, Band 52, Seiten 682 bis 691, 1968.

#### Beispiel 15

Die Verwendung von Polyhämoglobin zur Behandlung des hämorrhagischen Schocks wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurde einem Tier Blut entnommen bis zu einem geringen Standard-Blutdruck und der Blutverlust durch ein gleiches Volumen des zu untersuchenden Blutersatzstoffes ersetzt. Später wurde dem Tier erneut Blut entnommen und das Verhältnis der zweiten zu der ersten Entnahme als Blutungsindex  $Bl_2:Bl_1 \times 100$  angegeben. Bei diesem Verfahren wurde männlichen Ratten Blut bis zu einem niedrigen Standarddruck von 30 mm Hg entnommen und dieser Zustand 45 Minuten durch Entnahme von Blut zur Aufrechterhaltung des Druckes beibehalten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Volumen des entnommenen Blutes notiert und ergab den Wert  $Bl_1$  und durch Blut, Salzlösung, Dextran, Albumin, ursprüngliches Hämoglobin oder Polyhämoglobin ersetzt. Die Ratten konnten sich drei Stunden erholen und dann wurde erneut Blut entnommen bis zu einem Wert von 30 mm Hg, wobei man, wie oben angegebenen, den Wert für  $Bl_2$  erhielt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 angegeben und sie zeigen, daß polymerisiertes Hämoglobin bei diesem Modell eines hämorrhagischen Schocks wie ganzes Blut wirkt. In

der Tabelle sind die Blutersatzstoffe, die nach den Beispielen 2 bis 5 hergestellten Hämoglobine und B bedeutet das eigene Blut der Ratten, S eine physiologische Kochsalzlösung, A Albumin, H ursprüngliches bzw. natives Hämoglobin und D Dextran. Die Verfahren zur Messung des Blutungsindex sind beschrieben in Am. J. Physiol. Band 169, Seite 475, 1952, und Am. J. Physiol. Band 173, Seite 403, 1953.

Tabelle 3

<u>Ersatzstoffe</u>	<u>Blutungsindex</u>	<u>Anzahl der Tiere</u>
Beispiel 2	100 $\pm$ 13	3
Beispiel 3	48 $\pm$ 15	4
Beispiel 4	72 $\pm$ 23	5
Beispiel 5	75 $\pm$ 16	3
B	81 $\pm$ 13	24
S	27 $\pm$ 12	25
A	71 $\pm$ 9	3
H	36 $\pm$ 6	2
D	30 $\pm$ 11	17

Das Polyhämoglobin kann angewandt werden als Blutplasma-Ersatzstoff und Blutplasma-Streckmittel im Gemisch mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder mit anderen Plasma-Ersatzstoffen und Blutplasma-Streckmitteln. Die Träger können kristalloide einschließlich physiologischer Kochsalzlösung, ein Gemisch, bestehend aus Salzlösung und Glukose, Ringer's-Lösung, mit Laktat versetzte Ringer's-Lösung, Locke-Ringer's-Lösung, Krebs-Ringer's-Lösung, Hartmann's-Salzlösung und heparinisierte Natriumcitrat-Citronensäure-Dextrose-Lösung sein.

Das Polyhämoglobin kann im Gemisch vorliegen mit wasserlöslichen physiologisch geeigneten polymeren Plasma-Ersatzstoffen

../36

wie Polyäthylenoxid, Polyacrylamid, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol und Äthylenoxid-Polypropylenglykol-Kondensaten. Außerdem kann das Polyhämoglobin vermischt sein mit kolloidartigen Plasma-Ersatzstoffen und Blutplasma-Streckmitteln, wie linearen Polysacchariden einschließlich Dextranen mit einem Molekulargewicht von 40 000 bis 70 000, Gummiarabikum-Pektinen, (balanced) flüssiger Gelatine und Hydroxyäthylstärke. Im allgemeinen ist für die erfindungsgemäßen Zwecke das Polyhämoglobin in einem Mittel in einer Menge von ungefähr 1 bis 10 % im Gemisch mit einem oder mehreren der oben angegebenen Träger vorhanden. Die Mittel werden hergestellt durch Vermischen des Polyhämoglobins und Trägers in vorbestimmten Mengen. Zum Beispiel kann eine Blutersatzlösung, enthaltend 5 % Polyhämoglobin in normaler Kochsalzlösung hergestellt werden durch Zugabe von 5 g Polyhämoglobin zu der physiologischen Salzlösung, die 0,85 % Natriumchlorid in Wasser enthält, auf 100 ml. Die Polyhämoglobine können verabreicht werden, wie es bei Bluttransfusionen üblich ist.

Andere Anwendungsgebiete für Polyhämoglobine umfassen eine künstliche Sauerstoffaustauschlösung in üblichen Oxygenatoren wie Herznebenwegen (cardiac by-pass), außerhalb des Körpers gelegenen Kreislaufhilfen, hohlfaser- und folienartigen Membranen und zur Unterstützung des Kreislaufs bei kranken Patienten.

Das Polyhämoglobin kann angewandt werden als Quelle für Protein und Sauerstoff in der Mikrobiologie und als Nährstoff für aerobe Bazillen und Staphylokokken, wenn sichergestellt werden soll, daß der Nährstoff für die tierische und menschliche Ernährung sicher ist. Das Polyhämoglobin kann angewandt werden zur Lagerung und Konservierung von lebenden isolierten blutdurchströmten Säugetierorganen für eine eventuelle Transplantation in einen Empfänger als Ersatz für die Fähigkeit der roten Zellen bei Säugetieren, Sauerstoff zu transportieren.

LA-47 610

2607706

P a t e n t a n s p r ü c h e

- ① Wasserlösliches, polymerisiertes, vernetztes Hämoglobin, dadurch gekennzeichnet, daß es stromafrei ist und im Stande, reversibel einen Liganden zu binden.
2. Hämoglobin nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß<sup>es</sup> sein Molekulargewicht von 64000 bis 1 000 000 besitzt.
3. Hämoglobin nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Liganden in einer Menge bis zu 60  $\mu$ Mol Liganden pro Gramm Polyhämoglobin binden kann und eine Intrinsic-Viskosität von 0,04 bis 0,16 dl/g besitzt.
4. Hämoglobin nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Liganden Partialdruck bei halber Sättigung von 2,5 bis 120 mm Hg bei 37°C und neutralem pH-Wert besitzt.
5. Verfahren zur Herstellung von Hämoglobin nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man Stroma und Zelltrümmer von dem Hämoglobin entfernt, das entstandene stromafreie Hämoglobin, das entweder Liganden enthält oder nicht, mit einem polyfunktionalen Vernetzungsmittel, das mit den reaktionsfähigen Gruppen des Hämoglobins reagiert, unter einer Schutzatmo-

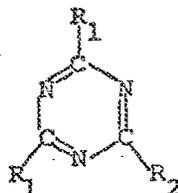
20

sphäre aus einem entsprechenden Gas und unter Bedingungen, bei denen ein wasserlösliches, vernetztes Polyhämoglobin entsteht, umsetzt und die Reaktion durch Zugabe eines Vernetzungsmittel-Desaktivators zu dem Reaktionsgemisch abbricht.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Äquivalent Hämoglobin mit 2,5 bis 300 Äquivalent des Vernetzungsmittels 0,25 bis 300 Stunden bei 0 bis 25°C unter Atmosphärendruck umsetzt.

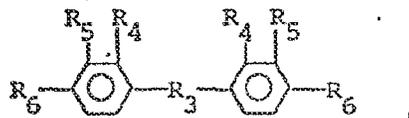
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion bei 0 bis 10°C durchführt.

8. Verfahren nach Anspruch 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als Vernetzungsmittel ein Triazin der Formel



in der R<sub>1</sub> ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 und R<sub>2</sub> einen nucleophilen Substituenten bedeutet;

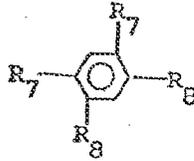
eine Verbindung der Formel



in der R<sub>3</sub> eine kovalente Bindung, eine Alkylengruppe mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, eine Phenylen; Oxy-, Sulfonyl- oder sek-Amino-Gruppe, R<sub>4</sub> ein Halogenatom oder eine Nitro-Gruppe, R<sub>5</sub> ein Wasserstoffatom, eine Nitro-Gruppe, eine Alkyl-Gruppe mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, eine Sulfo- oder Carbacyl-Gruppe und R<sub>6</sub> ein Halogenatom, eine Diazo-,

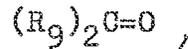
Isocyanato- oder Isothiocyanat-Gruppe bedeutet,

eine Verbindung der Formel

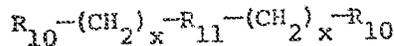
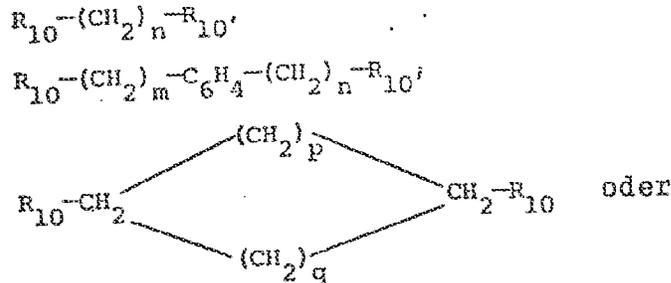


in der R<sub>7</sub> ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35, R<sub>8</sub> ein Wasserstoffatom oder eine Nitro-Gruppe bedeutet, wobei mindestens einer der Reste R<sub>8</sub> eine Nitro-Gruppe ist,

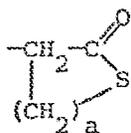
eine Verbindung der Formel



in der R<sub>9</sub> eine Wasserstoff- oder Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 bedeutet oder einer Verbindung der Formel



wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 8, m eine ganze Zahl von 0 bis 3, p eine ganze Zahl von 0 bis 4, q eine ganze Zahl von 1 bis 4, x eine ganze Zahl von 1 bis 5, R<sub>10</sub> eine funktionelle Isocyanat-, Vinyl-, Imino-, Isothiocyanat-, Isocyanid-, Aldehyd-, Epoxid-, Chlorformiat-, Trichlorformiat- oder Imidoalkylester-Gruppe oder eine Gruppe der Formel



oder



wobei a eine ganze Zahl von 1 bis 3, R<sub>12</sub> ein Halogenatom oder eine Azo-Gruppe und R<sub>11</sub> eine Oxy-, Sulfonyl- oder zweiwertige Amino-Gruppe bedeutet, verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine stöchiometrische Menge oder einen Überschuß bis zu 250 Äquivalent des Desaktivators pro Äquivalent Vernetzungsmittel zusetzt.

10. Verfahren nach Anspruch 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Desaktivator ein niedermolekulares primäres Amin verwendet.

11. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend einen Blutersatzstoff oder ein Blutplasmastreckmittel im Gemisch mit einem physiologisch geeigneten Träger, dadurch gekennzeichnet, daß der Blutersatzstoff oder das Streckmittel das wasserlösliche, polymerisierte, vernetzte Hämoglobin ist.

2607708

.47.

IR-47 610

C07G

7-00

AT:25.02.1976

OT:09.09.1976

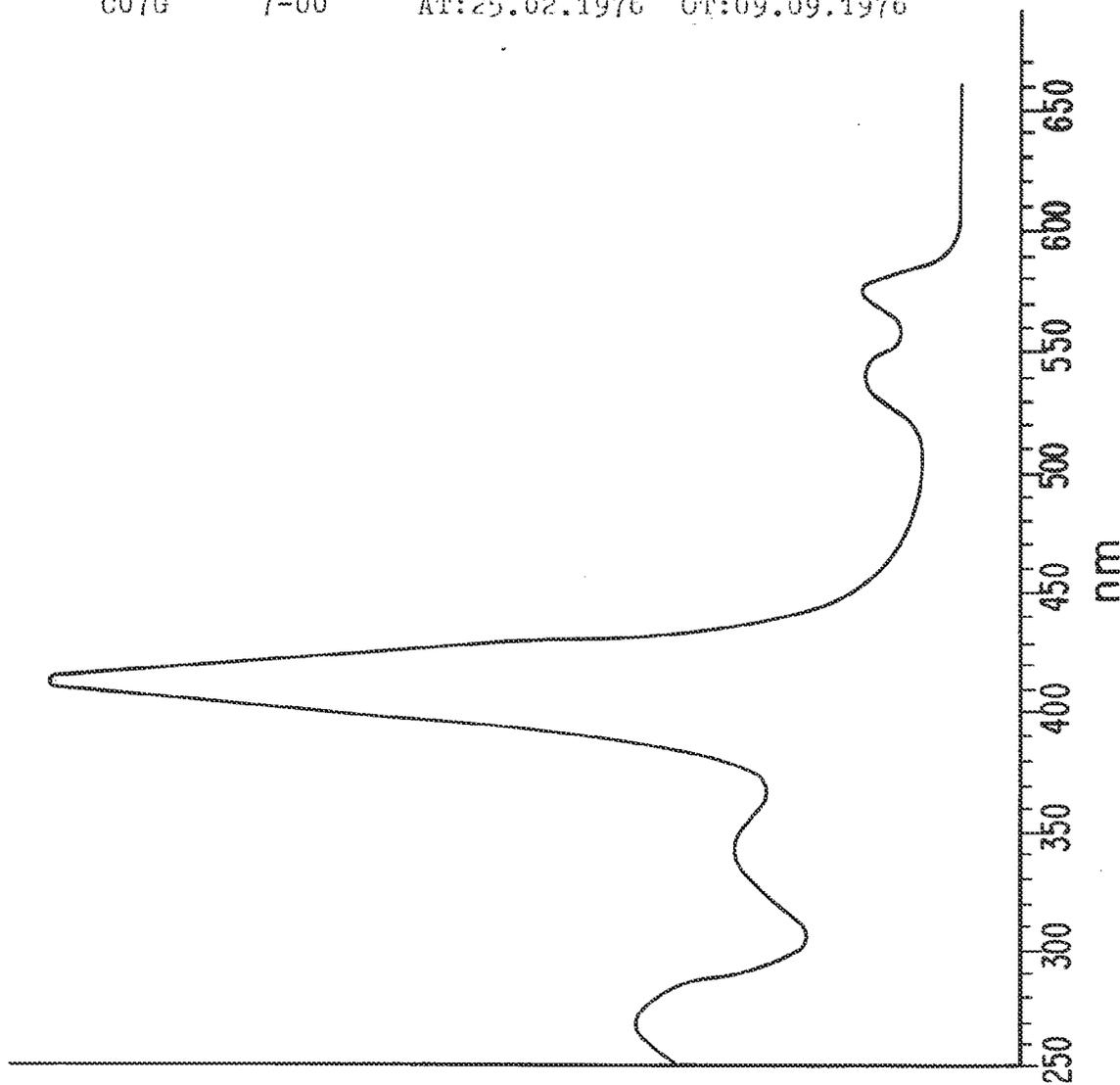


FIG. 1

609837/0973 ORIGINAL INSPECTED

. 41.

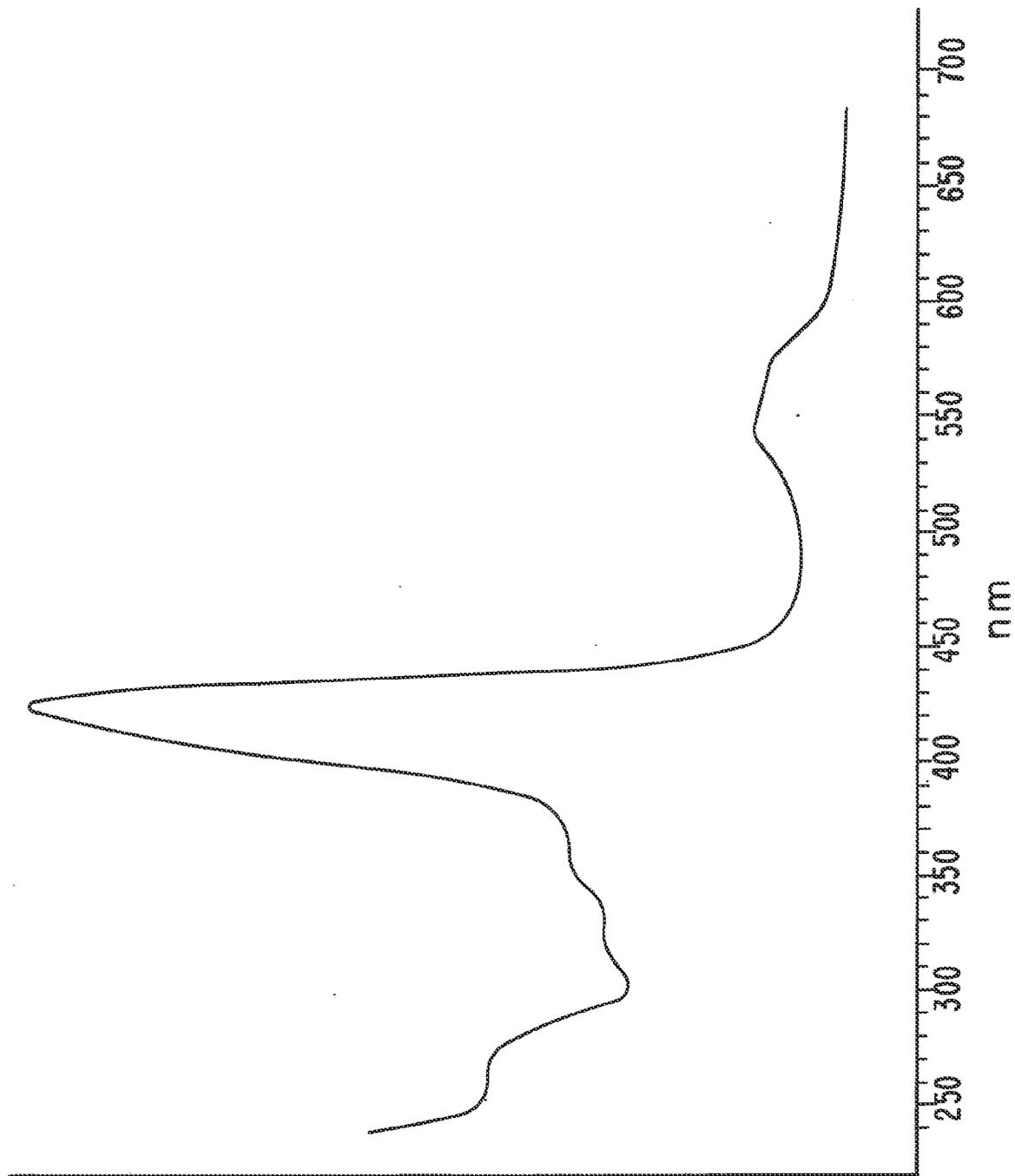


FIG.2

FIG. 3

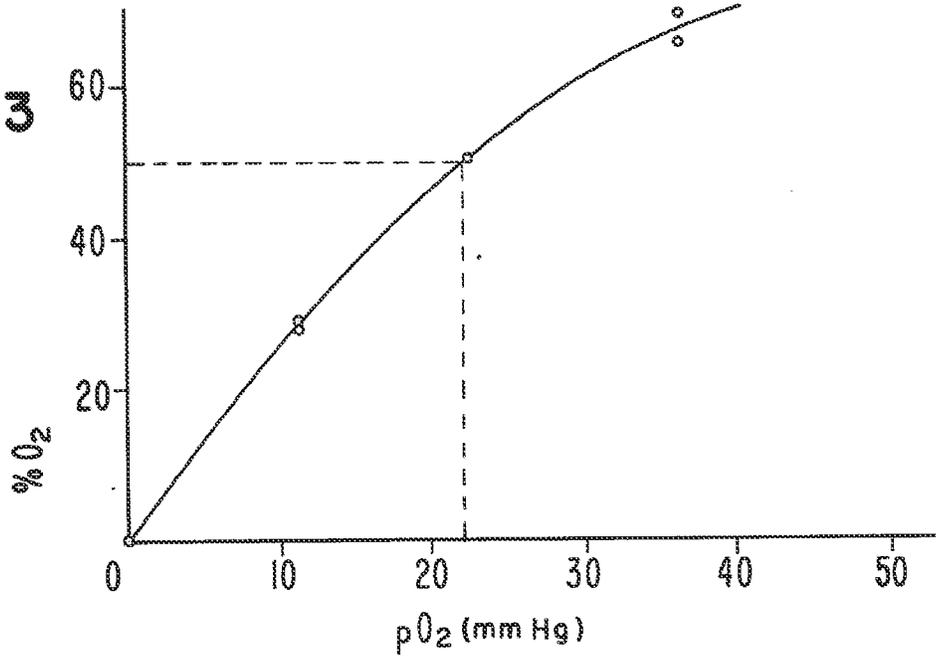


FIG. 4

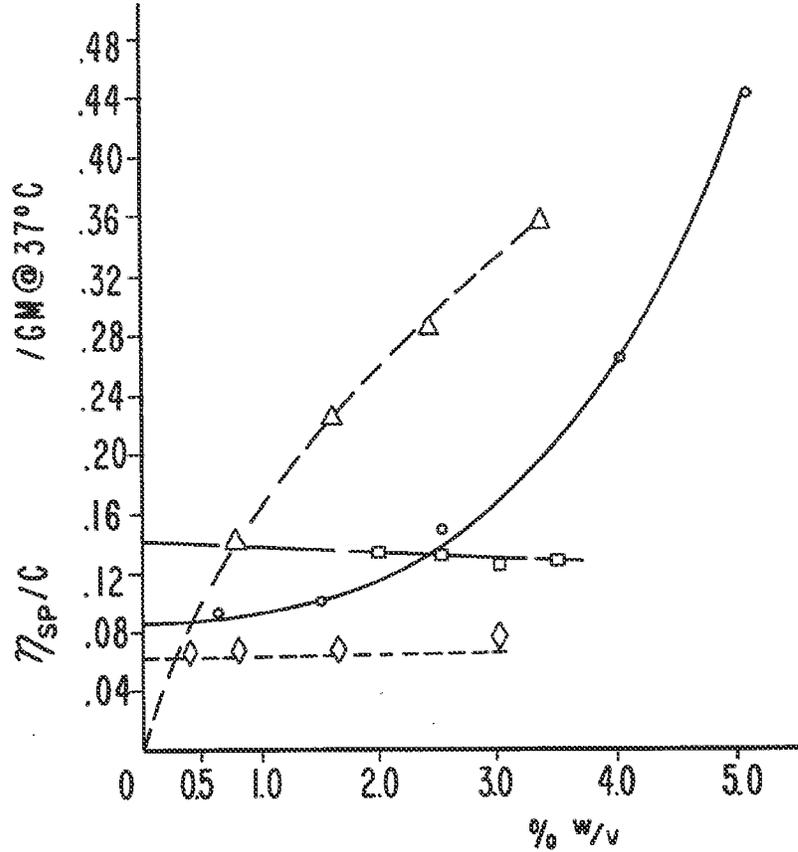


FIG. 5

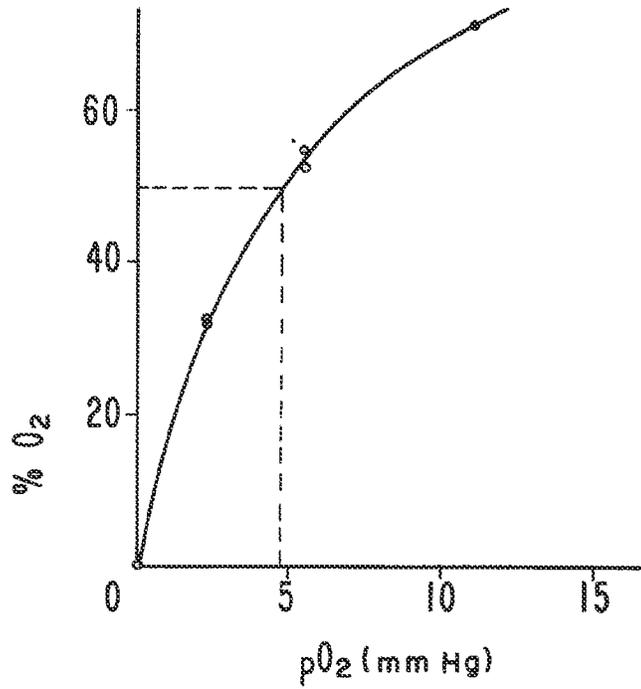


FIG. 8

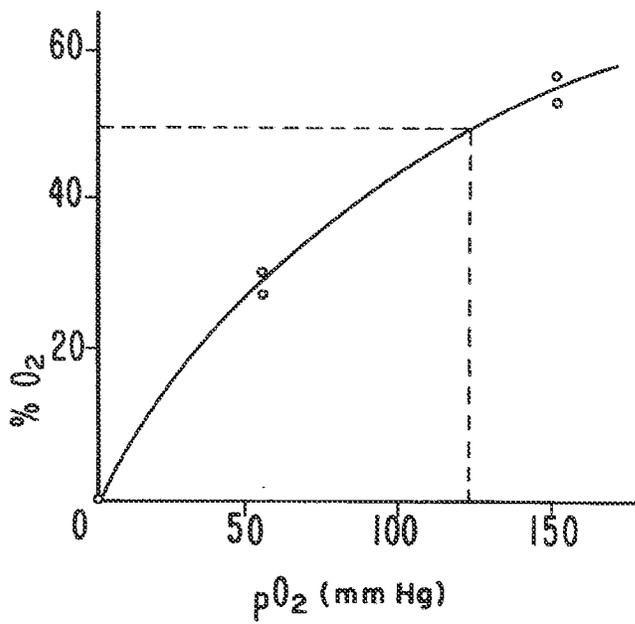
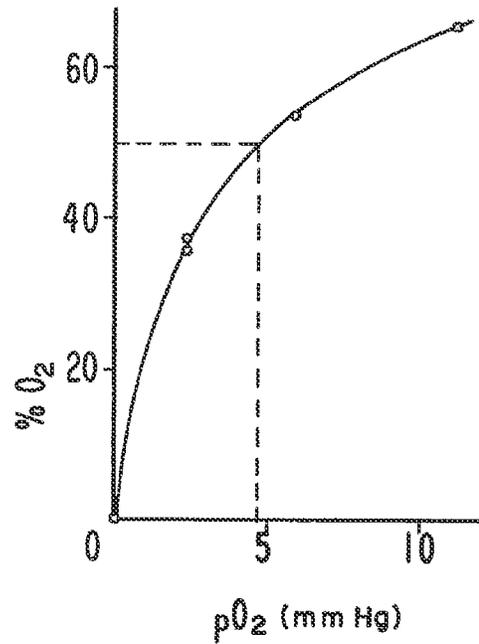
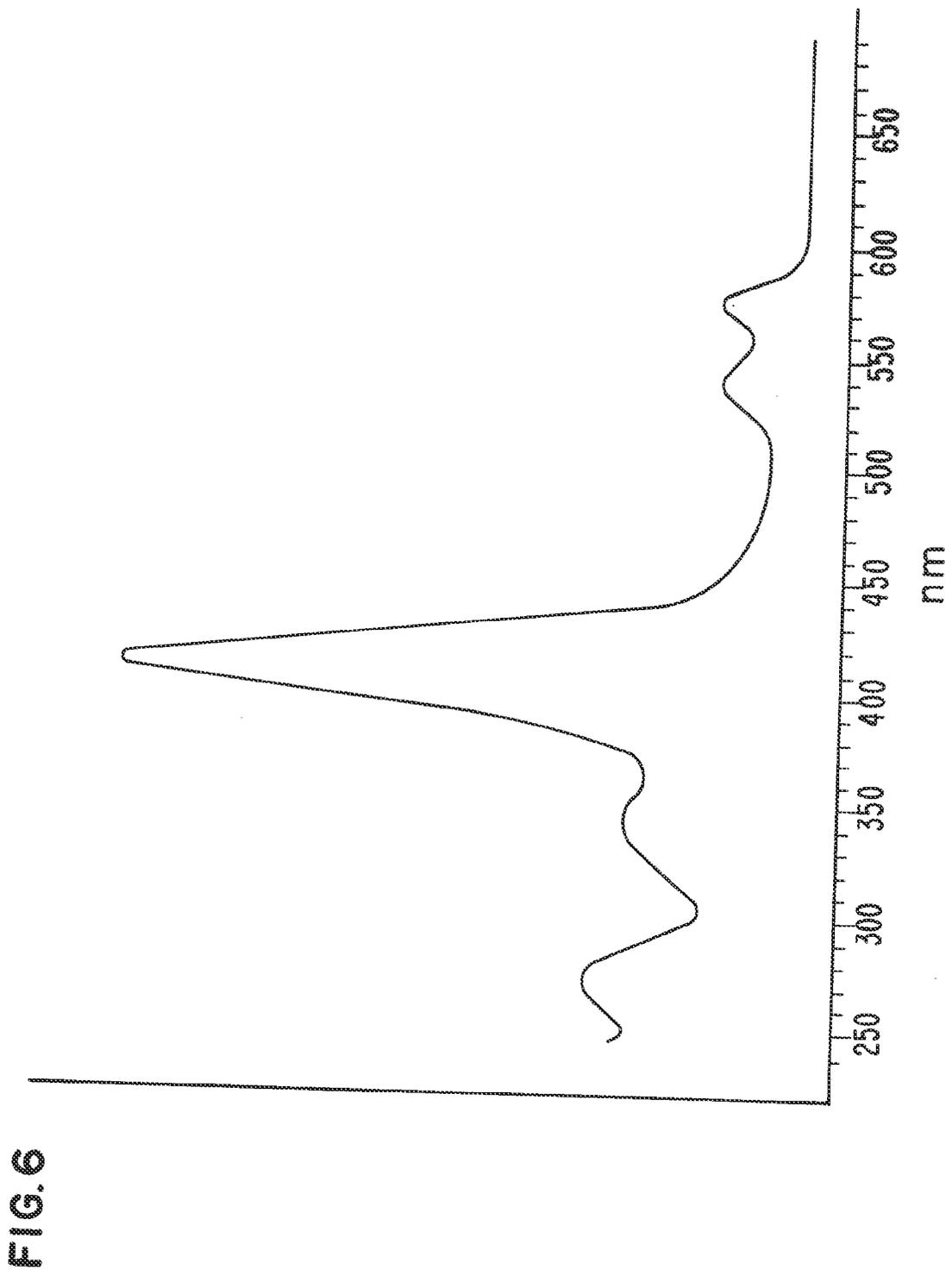


FIG. 10





45.

44-76-10

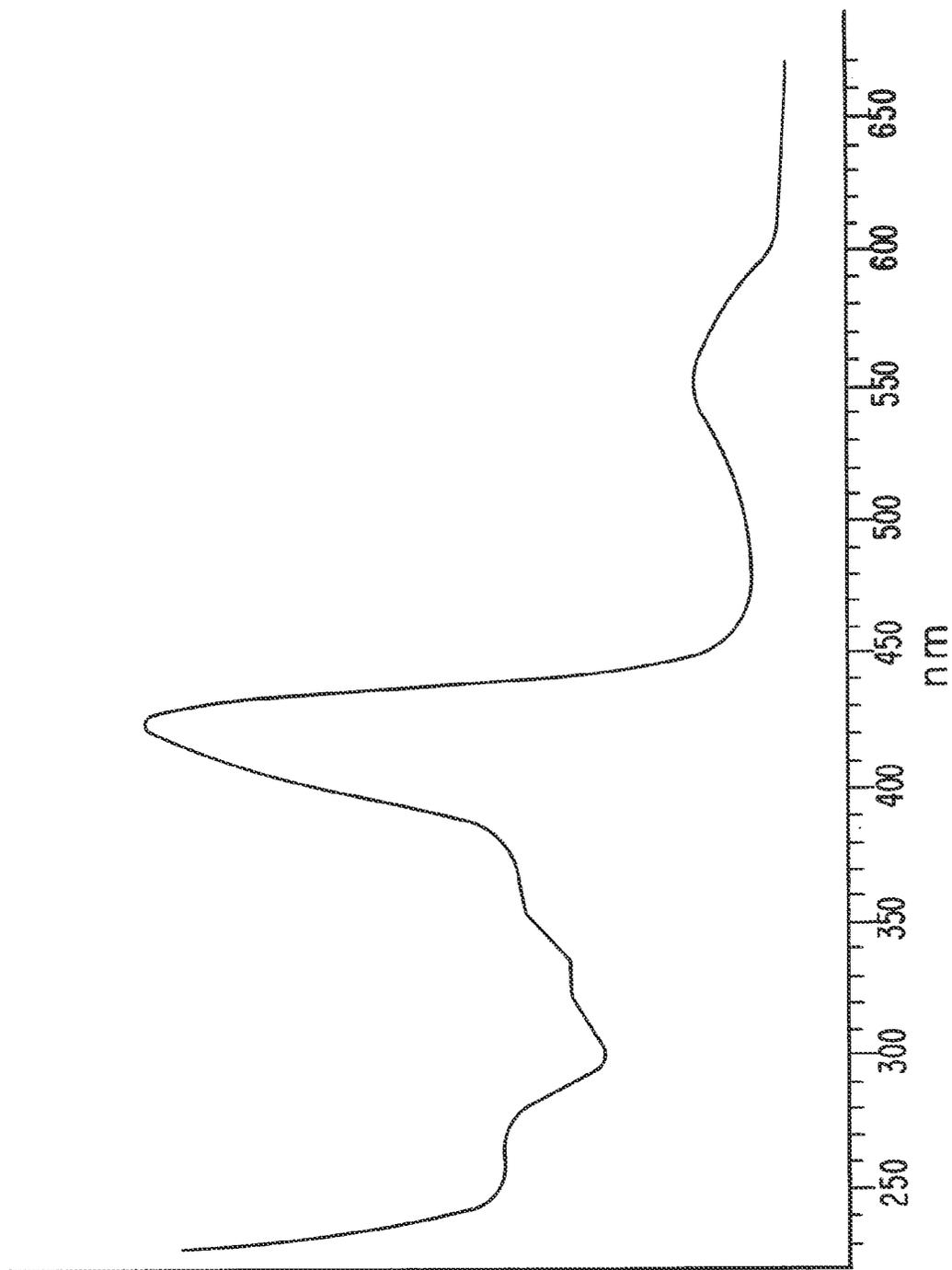


FIG. 7

. 46 .

47670

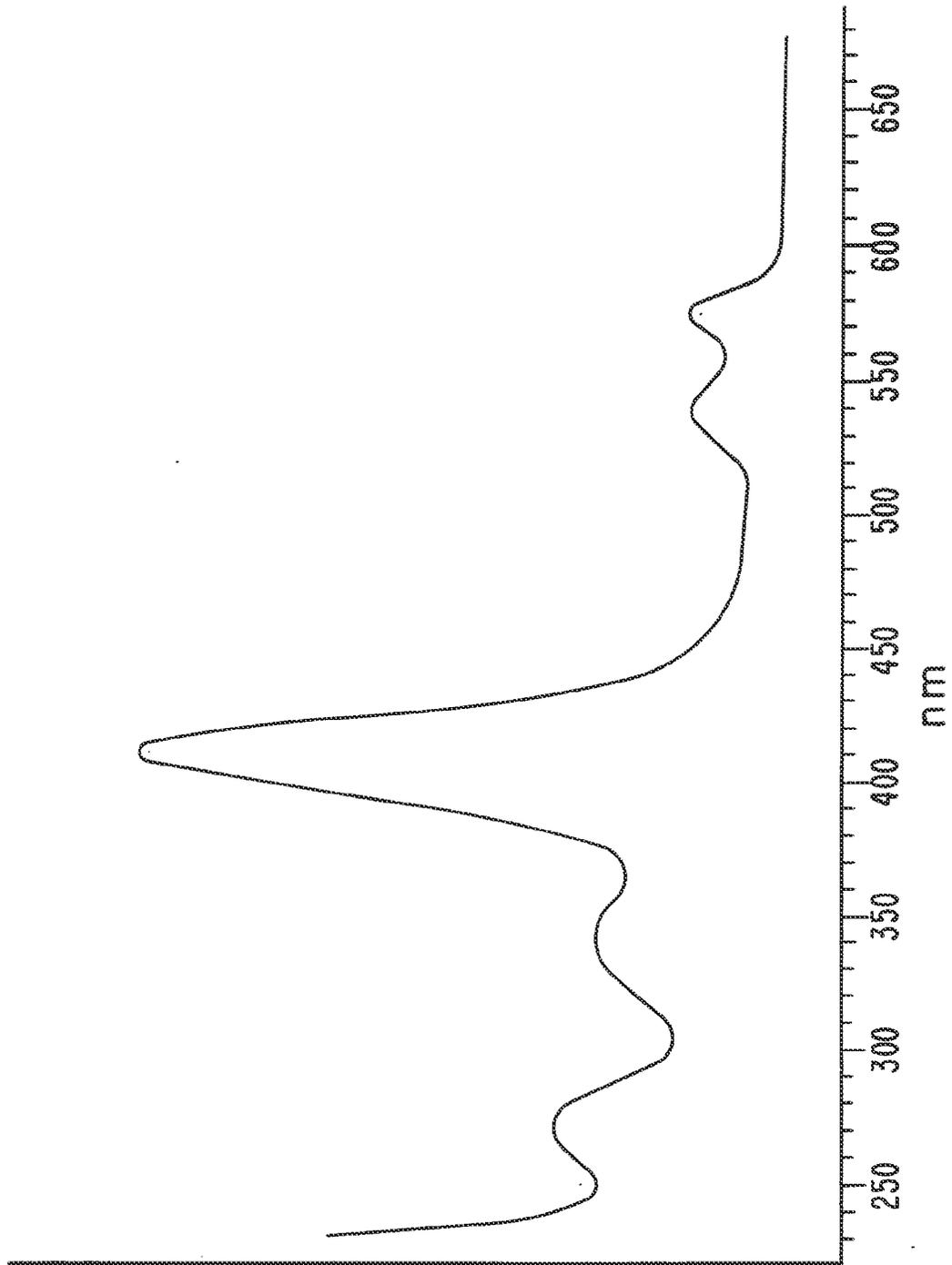


FIG.9